Campus de São Carlos

**ESTUDO DA DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DE
PROTEÍNAS EM REATORES COM BIOMASSA
IMOBILIZADA**

Giovana Tommaso

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**ESCOLA DE ENGENHARIA
DE SÃO CARLOS**

Universidade de São Paulo
Escola de Engenharia de São Carlos
Departamento de Hidráulica e Saneamento

**Estudo da Degradação Anaeróbia de Proteínas em
Reatores com Biomassa Imobilizada**

Giovana Tommaso

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Civil na área de concentração Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti

DEDALUS - Acervo - EESC

São Carlos
Junho de 2004

Class.	TESE EESC
Cod.	16065
Tombo	T 299/2
Sismo	1412861

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
e Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

T661e Tommaso, Giovana
Estudo da degradação anaeróbia de proteínas em
reatores com biomassa imobilizada / Giovana Tommaso. --
São Carlos, 2004.

Tese (Doutorado) -- Escola de Engenharia de São
Carlos-Universidade de São Paulo, 2004.

Área: Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Tit. Eugenio Foresti.

1. Degradação anaeróbia de proteínas. 2. Cinética da
degradação de proteínas. 3. Reatores com biomassa
imobilizada. 4. Reator anaeróbio horizontal de leito
fixo. 5. UASB. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **GIOVANA TOMMASO**

Tese defendida e julgada em 11-06-2004 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Titular **EUGENIO FORESTI (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **JOSÉ ALBERTO DOMINGUES RODRIGUES**
(Instituto Mauá de Tecnologia)

Aprovada

Prof. Dr. **GERALDO LIPPEL SANT'ANNA JUNIOR**
(Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ)

Aprovada

Prof. Dr. **VANILDO LUIZ DEL BIANCHI**
(UNESP/Campus de São José do Rio Preto)

Aprovada

Prof. Titular **WALTER BORZANI**
(Instituto Mauá de Tecnologia)

Aprovada

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Engenharia (Hidráulica e Saneamento)

Prof. Associado **MURILO ARAUJO ROMERO**
Vice-Presidente da Comissão de Pós-Graduação, em exercício.

A Deus pelo jardim da vida
A meus pais por me ensinarem a cultivá-lo
Aos meus irmãos por darem sabor especial ao cultivo
Ao Paulo por cultivá-lo comigo
E aos nossos meninos, Enzo, Lucca e Guido
por tornarem-no tão lindo, gostoso e divertido,
por darem sentido a ele...

Life is what happens to you
when you are busy making other plans
John Lennon

Agradecimentos

É mesmo impressionante, tem-se quatro anos para realizar uma Tese, e ela acaba sendo concluída de madrugada... Nesses quatro anos, muitas, incontáveis noites de sono foram perdidas para não perder nenhum movimento dos microrganismos. Na última noite, no meio de um seminário temático, eu, mais uma vez, jurei que nunca mais faria aquilo. E novamente mais uma noite, pelo menos só uma se foi, e com isso foi finalizada a etapa de escrita desse exemplar. Tudo ficou pronto e cheguei nesse momento mágico de agradecimentos. Quando a gente só lembra das coisas boas que ocorreram, sente saudades dos amigos, conclui que foi (é) feliz e graças a Deus sempre soube disso.

É impossível pensar em começar por outra pessoa que não o Eugenio. Grande mestre, grande orientador, em todos os sentidos da palavra. Acima de tudo um exemplo de dedicação, ética e genialidade. Pessoa que eu já admirava desde a graduação, quando eu demorava uma semana para ler uma separata, mas a maioria delas foi de autoria dele. Mesmo quando o tempo era pouco, suas observações tão necessárias foram impressionantemente contundentes, precisas, inenarráveis. Muito obrigada do fundo do meu coração, estar sob suas asas foi o que deu a tranquilidade necessária para tudo isso ocorrer. A seqüência lógica aponta para outro grande mestre, Marcelo. É difícil expressar tudo o que é preciso agradecer. Cada comentário, cada incentivo, cada crítica, fez com que eu continuasse mesmo quando dava vontade de parar. Com um jeito doce, mas duro e severo quando foi necessário, segurou aquela "pasta vermelha" posteriormente herdada pela Berna, e, com toda a competência, assegurou um ambiente maravilhoso de trabalho, o LPB. Mas acima de tudo, junto com o Eugenio, me orientou, como mestre quando necessário, como amigo sempre, e por isso eu terei de agradecer para sempre. Bernadete, querida Berna, que sempre que pode me ajudou com as "bichinhas", mas acima de tudo, sempre se preocupou em me orientar em outras partes da vida. Falando em outras partes da vida, preciso citar algumas pessoas, sem as quais, com certeza o mundo não seria tão maravilhoso: Janja, Beth, Samantha, Rojers, e Sávia, grandes amigos, conselheiros de todas as horas, de todos os assuntos e participantes extremamente ativos desse trabalho! Sem vocês esse trabalho não seria metade do que é. Agradeço a vocês tudo o que vivemos juntos, mas acima de tudo a Deus por ter colocado vocês em meu caminho. Nesse momento, gostaria também de agradecer todos os amigos do LPB que também fizeram a vida mais alegre e, com isso, contribuíram para esse trabalho: Fazolo, Douglas, Selma, Luiz Ricardo e Carol (não do LPB, do Luiz), Flavinha, Marilú, Ivana, Betão, Ari, Arnaldo, Fernandão, Karina, Elô, Wal, Tininha, Fábio,

Brucha, Mércinha, Isabel e Julinha. Gostaria também de agradecer à Valéria pelo lodo, pelos papos, e pelas aventuras mexicanas. Para a Dona Terezinha, muito, muito, mas muito obrigada também, criatura tão querida e tão sábia... Para a Pavi, Sá e Flavinha, muito, mas muito obrigada por tudo mesmo. Gostaria também de agradecer outras pessoas não ligadas à USP que fizeram com que a estadia em São Carlos fosse muito mais gostosa, aos amigos Thaís, Guilherme e Helena, à D. Inês, S. Zé, Sueli, Amália e Giovanni, Vera, Gê e Cida, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para esse trabalho, que agora não me recordo, não por terem menor importância, mas devido a uma cabeça cansada mesmo. Gostaria de agradecer a meus pais pelo apoio que cada um, a seu modo, sempre me deu, e a minha pequena grande família, Paulo, Enzo, Lucca e Guido, que agüentaram minhas crises, me deram apoio e alegria para continuar, sem falar no Lucca que parece ter esperado eu terminar o experimento da Soro Albumina para nascer... Finalmente gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa, pelos subsídios, e pelas oportunidades de crescimento profissional (os congressos). Por fim e não menos importante gostaria de agradecer ao meu oculto assessor... Muito obrigada pelos incentivos, foi muito bom receber seus pareceres. A todos vocês, muito, mas muito obrigada mesmo!

Gica

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de tabelas.....	vii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introdução e Justificativa.....	1
2. Objetivos.....	3
3. Revisão de Literatura.....	4
3.1. Proteínas.....	4
3.1.1. Métodos de medida da concentração de proteínas e seus subprodutos em águas residuárias.....	6
3.2. Degradação Anaeróbia de Proteínas.....	7
3.3. Degradação Anaeróbia de Águas Residuárias Ricas em Proteínas – Estado da Arte.....	8
3.4. Bactérias Proteolíticas.....	10
3.5. Filmes microbianos.....	11
3.6. Sistemas de Biomassa Fixa.....	13
3.7. Cinética em Biofilmes	14
3.8 Considerações Finais.....	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1. Desenho Experimental.....	18
4.1.1. Ensaios para estimativa de parâmetros cinéticos aparentes da degradação anaeróbia de proteínas presentes em substratos sintéticos.....	18
4.1.2. Ensaio comparativo entre um RAHLF e um reator do tipo UASB tratando água residuária proveniente de um abatedouro de aves.....	20
4.2. Descrição dos Reatores	22
4.2.1. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo.....	22
4.2.2. Reator UASB.....	22
4.3. Efluentes Sintéticos.....	22
4.4. Inoculo.....	25
4.5. Análises Físico-Químicas.....	25
4.5.1. Análises de monitoramento.....	25
4.5.2. Análise de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Duodecil Sulfato de Sódio (SDS – PAGE).....	25

4.6. Análises Microbiológicas.....	26
4.6.1. Análise de microscopia eletrônica de varredura.....	26
4.6.2. Análise de microscopia óptica.....	27
4.6.3. Hibridação Fluorescente In Situ (FISH).....	27
4.6.4. Técnica de PCR e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	31
5. Resultados e Discussão.....	32
5.1 Modelo Cinético.....	32
5.2. Resultados dos Ensaio utilizando Soro Albumina Bovina (S.A.B.)	35
5.2.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.....	35
5.2.2. Análises Microbiológicas.....	45
5.3. Resultados dos Ensaio Utilizando Peptona.....	59
5.3.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.....	59
5.3.2. Análises Microbiológicas.....	76
5.4. Resultados dos Ensaio Utilizando Caseína.....	107
5.4.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.....	107
5.4.2. Análises Microbiológicas.....	118
5.5. Comparação entre os substratos sintéticos utilizados nos ensaios utilizando RAHLFs para a degradação anaeróbia de substratos contendo proteína como única ou principal fonte de carbono.....	130
5.6. Resultados dos Ensaio Utilizando Água Residuária Proveniente de Abatedouro de Aves.....	139
5.6.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.....	139
5.6.2. Análises Microbiológicas.....	149
6. Conclusões.....	157
7. Sugestões.....	160
8. Bibliografia Consultada.....	161
Apêndice I.....	169
Apêndice II.....	179
ApêndiceIII.....	182

Lista de Figuras

Figura 3.1: Ligação peptídica (fonte: Nelson & Cox, 2000).....	5
Figura 3.2.: Quatro níveis de estrutura protéica (fonte: Nelson & Cox, 2000).....	5
Figura 4.1. Esquema do desenho experimental realizado nos ensaios de estimativa de parâmetros cinéticos e inferência de rotas metabólicas do processo de degradação anaeróbia de proteínas.....	21
Figura 4.2: Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação <i>in situ</i>	29
Figura 5.1.1: Diagrama do modelo cinético de reações irreversíveis em série e paralelo de primeira ordem com dois produtos intermediários.....	34
Figura 5.2.1. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) como fonte de carbono.....	36
Figura 5.2.2. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e carboidratos, e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono.....	37
Figura 5.2.3. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e carboidratos, e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B., carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	37
Figura 5.2.4. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. (DQO = 600 mg. <i>l</i> ⁻¹) como fonte de carbono.....	38
Figura 5.2.5. Perfis de produção de nitrogênio na forma amoniacal: RAHLF alimentado com S.A.B. (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) como fonte de proteínas.....	41
Figura 5.2.6. Perfis de concentração de matéria orgânica (expressa como DQO) nas quatro condições operacionais onde a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas.....	43
Figura 5.2.7: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo SAB, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	44
Figura 5.2.8: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) como única fonte de carbono.....	50
Figura 5.2.9: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB e carboidratos como fontes de carbono.....	52
Figura 5.2.10: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB, carboidratos e lipídeos como fontes de carbono.....	54
Figura 5.2.11: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com somente com S.A.B. (DQO = 600 mg. <i>l</i> ⁻¹), carboidratos e lipídeos como fontes de carbono.....	56

Figura. 5.2.12: Morfologias adquiridas em microscópio eletrônico de varredura presentes em matrizes de poliuretano provenientes de RAHLF alimentado com S.A.B. como fonte de proteínas. Aumento de 5000 vezes em todas as micrografias.....	58
Figura 5.3.1.: Perfis das concentrações de proteína e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l ⁻¹).....	60
Figura 5.3.2.: Perfis das concentrações de proteína, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona e carboidratos como fontes de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l ⁻¹).....	60
Figura 5.3.3.: Perfis das concentrações de proteína, carboidratos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona, carboidratos e lipídios como fontes de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l ⁻¹).....	61
Figura 5.3.4.: Perfis das concentrações de proteína e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l ⁻¹).....	61
Figura 5.3.5: Composição da peptona.....	64
Figura 5.3.6. Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal no RAHLF alimentado com substratos sintéticos com peptona como fonte de proteínas.....	65
Figura 5.3.7.: Perfis do teor de matéria orgânica (expressa com DQO) nas quatro condições operacionais onde a peptona foi utilizada como fonte de proteínas.....	66
Figura 5.3.8 – Perfis de pH nos experimentos em que a peptona foi utilizada como fonte de proteínas e a concentração de bicarbonato de sódio afluente foi de 1000 mg.l ⁻¹	68
Figura 5.3.9: Perfis das concentrações de proteínas e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹).....	69
Figura 5.3.10: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos, e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹).....	69
Figura 5.3.11: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹).....	70
Figura 5.3.12: Perfis das concentrações de proteína e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹).....	70
Figura 5.3.13.: Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal no RAHLF alimentado com substratos sintéticos com peptona como fonte de proteínas e concentração de alcalinidade afluente igual a 400 mg.l ⁻¹ : RAHLF alimentado com Peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹).....	74

Figura 5.3.14.: Perfis de concentração de matéria orgânica (expressa com DQO) nas quatro condições operacionais onde a peptona foi utilizada como fonte de proteínas (concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹).....	75
Figura 5.3.15.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 400 mg.l ⁻¹).....	78
Figura 5.3.16.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono.....	81
Figura 5.3.17.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos como única fonte de carbono.....	85
Figura 5.3.18.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 600 mg.l ⁻¹).....	87
Figura 5.3.19: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com peptona. (a) e (c) coloração com DAPI, (b) e (d), células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b), relacionados ao ponto 1 de amostragem, e (c) e (d), relacionados ao ponto 2.....	89
Figura 5.3.20: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com peptona como fonte de carbono. (a) e (c) coloração com DAPI, (b) e (d) células hibridadas com a sonda EUB338. Pares (a) e (b), relacionados ao ponto 1 de amostragem, e (c) e (d), relacionados ao ponto 2.....	90
Figura 5.3.21: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Archaea</i> (ARC915) e <i>Bacteria</i> (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona como fonte de carbono.....	91
Figura 5.3.22.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 400 mg.l ⁻¹), com concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹	93
Figura 5.3.23: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidrato. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI; (b), (d), (f) e (h) células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; (e) e (f) correspondentes ao ponto 3; e (g) e (h) correspondentes ao ponto 4.....	94
Figura 5.3.24: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos com fonte de carbono. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI. (b), (d), (f) e (h) células hibridadas com a sonda EUB338. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; (e) e (f) correspondentes ao ponto 3 e (g); e (h) correspondentes ao ponto 4.....	95
Figura 5.3.25: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Archaea</i> (ARC915) e <i>Bacteria</i> (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono.....	96

Figura 5.3.26.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹).....	98
Figura 5.3.27: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos. (a), (c) e (e) coloração com DAPI; (b), (d) e (f) células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; e (e) e (f) correspondentes ao ponto 3.....	99
Figura 5.3.28: Hibridação <i>in situ</i> das amostras do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos com fonte de carbono. (a), (c) e (e) coloração com DAPI; (b), (d) e (f) células hibridadas com a sonda EUB 338. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; e (e) e (f) correspondentes ao ponto 3.....	100
Figura 5.3.29: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios <i>Archaea</i> (ARC915) e <i>Bacteria</i> (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbio de leite fixo alimentado com substrato sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	101
Figura 5.3.30.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹).....	103
Figura 5.3.31: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 600 mg.l ⁻¹) com concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹	106
Figura 5.4.1.: Perfis das concentrações de proteínas e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e tempo de adaptação da biomassa de 65 dias.....	108
Figura 5.4.2.: Perfis das concentrações de proteínas e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e tempo de adaptação da biomassa de 28 dias.....	108
Figura 5.4.3: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína e carboidratos como fonte de carbono.....	109
Figura 5.4.4: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	109
Figura 5.4.5: Perfis das concentrações de proteínas e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e 10 mg.l ⁻¹ de ferro afluente.....	110
Figura 5.4.6. Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de proteínas.....	116

Figura 5.4.7.: Perfis de DQO nas cinco condições operacionais onde a caseína foi utilizada como fonte de proteínas.....	117
Figura 5.4.8 : Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono e período de adaptação igual a 68 dias.....	121
Figura 5.4.9: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono e período de adaptação igual a 28 dias.....	123
Figura 5.4.10 : Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína e carboidratos como fonte de carbono.....	127
Tabela 5.4.11.: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	129
Figura 5.6.1. – Perfil de DQO solúvel ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	139
Figura 5.6.2. – Perfil de DQO bruta ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	140
Figura 5.6.3. – Perfil de DQO particulada ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	140
Figura 5.6.4. – Perfil da concentração de proteínas ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	141
Figura 5.6.5. – Perfil de DQO solúvel e ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	141
Figura 5.6.6. – Perfil de DQO total ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	142
Figura 5.6.7. – Perfil de DQO particulada ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	142
Figura 5.6.8. – Perfil da concentração de proteínas ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves.....	143
Figura 5.6.9.: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com água residuária de abatedouro de aves.....	145
Figura 5.6.10.: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do reator UASB alimentado com água residuária de abatedouro de aves.....	145

Figura 5.6.11: perfis de pH ao longo dos reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves, A: RAHLF. B: Reator tipo UASB.....	148
Figura 5.6.12: Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal ao longo dos reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves, A: RAHLF. B: Reator tipo UASB.....	148
Figura 5.6.13: Morfologias presentes nos reatores tratando água residuária proveniente de abatedouro de aves sob microscopia eletrônica de varredura: (a), cocos, e alguns filamentos; (b), bacilos, filamentos e uma morfologia semelhante a <i>Methanosaeta sp.</i> ; (c), bacilos e filamentos; e (d), bacilos retos e curvos.....	149
Figura 5.6.14: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves.....	151
Figura 5.6.15: Morfologias presentes ao longo do reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves.....	152
Figura 5.6.16 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (45,1% - 58,44% valores de percentagem do gradiente desnaturante).....	154
Figura 5.6.17 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Bacteria</i> nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (38,8% - 50,44% valores de percentagem do gradiente desnaturante).....	155
Figura 5.6.18 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Archaea</i> nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4 e 5 do Reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (40,6% - 52,22% valores de percentagem do gradiente desnaturante).....	155
Figura 5.6.19 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio <i>Bacteria</i> nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4 e 5 do Reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (43,2% - 56,6% valores de percentagem do gradiente desnaturante).....	156

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Composição de sais minerais presentes nos substratos sintéticos utilizados no experimento.....	23
Tabela 4.2.: Fontes de carbono presentes nos efluentes sintéticos fornecidos ao RAHLF.....	24
Tabela 4.3. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação <i>in situ</i>	28
Tabela 4.4. Protocolos de hibridação.....	30
Tabela 5.2.1: Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando S.A.B. como fonte de proteínas nos substratos sintéticos fornecidos ao RAHLF.....	38
Tabela 5.2.2. Velocidades iniciais de degradação das proteínas nos reatores onde a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas.....	41
Tabela 5.2.3: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo S.A.B. (DQO= 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.....	49
Tabela 5.2.4: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.....	51
Tabela 5.2.5: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo S.A.B. carboidratos e lipídeos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.....	53
Tabela 5.2.6.: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo S.A.B. (DQO= 600 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.....	55
Tabela 5.3.1 Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se peptona como fonte de proteínas nos substratos sintéticos fornecidos ao RAHLF (concentração de bicarbonato de sódio afluente igual a 1000 mg.l ⁻¹).....	64
Tabela 5.3.2 Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se concentração de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l ⁻¹ e peptona como fonte de proteínas nos substratos sintéticos fornecidos ao RAHLF.....	71
Tabela 5.3.3 Velocidades iniciais de degradação das proteínas nos reatores onde a peptona foi utilizada como fonte de proteínas com concentração de bicarbonato de sódio afluente de 400 mg.l ⁻¹	72
Tabela 5.3.4.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona (DQO= 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono contendo concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.l ⁻¹	77

Tabela 5.3.5: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético, contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.l ⁻¹).....	80
Tabela 5.3.6: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.l ⁻¹).....	83
Tabela 5.3.7.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.l ⁻¹).....	86
Tabela 5.3.8.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹).....	92
Tabela 5.3.9.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹).....	97
Tabela 5.3.10.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona e carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹).....	102
Tabela 5.3.11.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono e concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l ⁻¹	105
Tabela 5.4.1 Constantes cinéticas do modelo proposto para todas as condições estudadas com caseína como fonte de proteínas.....	111
Tabela 5.4.2 Velocidades iniciais de degradação das proteínas nos reatores onde a caseína foi utilizada como fonte de proteínas.....	112
Tabela 5.4.3.: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína. (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono, período de adaptação igual a 68 dias, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência	120
Tabela 5.4.4: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína. (DQO= 400 mg.l ⁻¹) como única fonte de carbono, período de adaptação 65 dias, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência	122
Tabela 5.4.5: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína e carboidratos como fonte de carbono e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência	126
Tabela 5.4.6: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com substrato sintético contendo caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.....	128

Tabela 5.5.1.: Constantes observadas do modelo cinético de reações em série e paralelo de primeira ordem em todos os ensaios realizados.....	134
Tabela 5.5.2.: Velocidades iniciais de degradação de proteínas em todos os ensaios realizados.....	135
Tabela 5.5.3.: Valores residuais de matéria orgânica, ácido acético e propiônico e eficiência de remoção de proteínas nos efluentes dos RAHLFs utilizados.....	138
Tabela 5.6.1.: Velocidades de degradação de substratos nos dois reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves.....	145
Tabela 5.6.2.: Velocidades iniciais de degradação de substratos nos dois reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves.....	147
Tabela 5.6.3.: Frequência relativa de aparição dos microrganismos possíveis de visualização nas amostras provenientes dos reatores utilizados na degradação de água residuária de abatedouro de aves.....	150
Tabela I.1.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono....	170
Tabela I.2.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono.....	170
Tabela I.3.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B., carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	171
Tabela I.4.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono ...	171
Tabela I.5.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono e 1 g l^{-1} de bicarbonato de sódio.....	172
Tabela I.6.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona e carboidratos como fonte de carbono e 1 g l^{-1} de bicarbonato de sódio.....	172
Tabela I.7.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono e 1 g l^{-1} de bicarbonato de sódio.....	173
Tabela I.8.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 600 mg. l^{-1}) como fonte de carbono e 1 g l^{-1} de bicarbonato de sódio.....	173
Tabela I.9.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono e 400 mg l^{-1} de bicarbonato de sódio.....	174

Tabela I.10.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona e carboidratos como fonte de carbono e 400 mg . l ⁻¹ de bicarbonato de sódio.....	174
Tabela I.11.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono e 400 mg . l ⁻¹ de bicarbonato de sódio.....	175
Tabela I.12.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e 400 mg . l ⁻¹ de bicarbonato de sódio.....	175
Tabela I.13.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e 28 dias de tempo de adaptação da biomassa.....	176
Tabela I.14.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e 65 dias de tempo de adaptação da biomassa.....	176
Tabela I.15.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) como fonte de carbono e 10 mg . l ⁻¹ de sulfato ferroso.....	177
Tabela I.16.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína e carboidratos como fonte de carbono.....	177
Tabela I.17.: Concentrações de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.....	178
Tabela II.1.: Valores de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético à base de SAB.....	180
Tabela II.2.: Valores de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona, (1 g . l ⁻¹ de bicarbonato de sódio).....	180
Tabela II.3.: Valores de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona, (400 mg . l ⁻¹ de bicarbonato de sódio).....	180
Tabela II.4.: Valores de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína.....	181
Tabela III.1.:Valores de DQO e concentração de proteínas e derivados de hidrólise nos perfis experimentais do UASB alimentado com efluente de abatedouro de aves.....	183
Tabela III.2.:Valores de DQO e concentração de proteínas e derivados de hidrólise nos perfis experimentais do UASB alimentado com efluente de abatedouro de aves.....	183

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi realizar estudos acerca da degradação anaeróbia de proteínas no tocante à cinética de consumo de substrato e às rotas metabólicas presentes no processo.

Inicialmente, realizou-se um estudo comparativo da degradação de efluentes sintéticos em Reatores Anaeróbios Horizontais de Leito Fixo (RAHLFs) em escala de bancada. Nesse intuito, foi proposto um modelo cinético de primeira ordem de reações em série e paralelo, que permitiu a estimativa dos parâmetros cinéticos das várias etapas do processo estudado. As fontes de carbono nos efluentes sintéticos foram primeiramente compostas por compostos protéicos, tendo sido posteriormente adicionadas fontes de carboidratos e lipídeos à sua composição. Nesse intuito, utilizaram-se duas proteínas, caseína e soro albumina bovina (S.A.B.), e um hidrolisado protéico, peptona.

Os resultados preditos pelo modelo cinético proposto apresentaram boa correlação com os dados experimentais e, com isso, foi possível o entendimento dos vários aspectos envolvidos na degradação de compostos protéicos em reatores que apresentam regime de escoamento predominantemente pistonado. A peptona foi mais rapidamente consumida, seguida pela caseína e finalmente pela S.A.B.. A presença de lipídeos nos efluentes sintéticos utilizados se constituiu no maior problema para o processo estudado. Análises de microscopia e biologia molecular mostraram que houve realocação da biomassa nos RAHLFs à medida que foram adicionadas fontes alternativas de carbono aos efluentes sintéticos à base de proteína. As morfologias encontradas foram comuns em todos os ensaios realizados, tendo predominado as semelhantes a *Methanosaeta sp.*, bacilos fluorescentes e não fluorescentes, bacilos curvos e cocos não fluorescentes. Também foram visualizados três tipos de filamentos, espiroquetas e morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.*.

A segunda etapa do presente trabalho foi o estudo comparativo do processo de degradação de água residuária proveniente de abatedouro de aves em dois reatores um UASB e um RAHLF. O modelo cinético de primeira ordem se ajustou bem aos dados de decaimento de matéria orgânica em ambos os reatores. Dessa forma, foi possível concluir que no reator UASB, o mecanismo de adsorção do material colóide e solúvel nos grânulos parece ter regulado o processo, resultando em maior velocidade de remoção dessas frações de matéria orgânica. No RAHLF, o que parece ter regulado o processo foi a retenção de sólidos orgânicos, aumentando, dessa forma, a velocidade de remoção dessa fração de matéria orgânica.

Palavras-chave: degradação anaeróbia de proteínas; cinética da degradação de proteínas; reatores com biomassa imobilizada; Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo; UASB.

Abstract

This work reports on the anaerobic degradation of proteins from the standpoint of substrate consumption kinetics and metabolic routes. Initially, a comparative study of synthetic effluents in a bench scale horizontal-flow anaerobic immobilized biomass (HAIB) reactor was carried out. For this purpose, a kinetic model of irreversible first-order series-parallel reactions with two intermediate products was proposed. This allowed the estimative the kinetic parameters of several steps of the process. The carbon source in the synthetic effluents was composed primarily of casein, peptone and bovine serum albumin (B.S.A). Then, sources of carbohydrate and lipid were added to the composition.

The proposed model fitted the experimental protein degradation data well and allowed the best comprehension of the process. Thus it was possible to understand several aspects about the degradation of the protein substrates utilized in HAIB reactors. In relation to degradation rate, it was concluded that peptone was the most rapidly consumed, followed by casein, and finally BSA. Regarding substrate composition, the major problem for the studied process was the presence of lipids in the synthetics effluents.

The results obtained from the microbiological analysis showed that relocation of biomass in the HAIBs reactors happened in correlation with the addition of alternative carbon sources to synthetic protein effluents. In all assays, common morphologies were found. These were predominantly *Methanosaeta sp.*-like archaeas, fluorescent bacillus (three types), non-fluorescent bacillus (6 types), curved bacillus and non-fluorescent coccus. Three types of filaments, spirochetes, and *Methanosarcina sp.*-like archaeas were also found.

In a second phase, a comparative analysis of the degradation process of wastewater from a poultry slaughterhouse was carried out in two different reactors, one up flow anaerobic sludge blacked (UASB), and one HAIB. The first order kinetic model proposed fitted the experimental organic matter degradation data well in UASB and HAIB reactors treating residual water from avian abattoirs. In the UASB reactor, the adsorption mechanism of the granules for colloid and soluble material seems to regulate the process. This results in a higher rate of removal for these fractions of organic material. However, in the HAIB reactor, what seems to be controlling the process was the retention of organic solids, which increased the removal rate for this fraction of organic material.

Key words: anaerobic protein degradation, kinetic of protein degradation, immobilized biomass reactors, Horizontal-flow Anaerobic Immobilized Sludge reactor, Up flow Anaerobic Sludge Blanked

Capítulo 1

Introdução e Justificativa

A importância da biodigestão anaeróbia, como processo de tratamento de resíduos orgânicos, cresceu de forma extraordinária nas últimas décadas, principalmente por apresentar balanço energético mais favorável que os processos aeróbios convencionais. Trata-se de um processo natural, através do qual um consórcio microbiano produz metano e dióxido de carbono a partir da degradação da matéria orgânica, na ausência de oxigênio molecular (Foresti, 1994).

De acordo com Rajeshwari *et al.* (2000), a digestão anaeróbia é considerada a melhor opção para o tratamento de efluentes cuja composição contemple elevadas concentrações de matéria orgânica. De acordo com os autores, a presença de componentes biodegradáveis, associada às vantagens do processo anaeróbio sobre outras tecnologias disponíveis, torna-o uma opção extremamente atrativa para a solução dos problemas ambientais causados pela má disposição desse tipo de águas servidas.

A fração biodegradável das águas residuárias contém uma grande variedade de compostos orgânicos que são biodegradados simultaneamente, mas existem relativamente poucos estudos sobre como o uso desses múltiplos substratos afeta a cinética de degradação de compostos específicos, como as proteínas, em ambientes anaeróbios.

Gadelha *et al.* (2000), estudando o desempenho de reatores anaeróbios UASB, na degradação da matéria orgânica presente em esgotos sanitários, constatou que a maior parte da fração orgânica do efluente era constituída por proteínas. Com isso, acredita-se que no processo de degradação de proteínas esteja a chave para o aumento de eficiência dos processos anaeróbios, uma vez que, especificamente no tocante à fração líquida, ainda não

foram atingidas eficiências comparáveis às encontradas nos processos aeróbios de tratamento biológico.

De fato, devido à elevada massa molecular dos compostos protéicos, essas substâncias podem estar presentes na fração orgânica coloidal das águas residuárias, e essa fração é apontada por Petrury & Lettinga (1997), como a parte mais difícil de ser degradada em processos anaeróbios de tratamento de despejos.

Embasados na dificuldade de degradação da fração protéica, alguns autores como Breure *et al.* (1986) e Martins *et al.* (1991), propuseram a separação dessa fração do restante da matéria orgânica a ser degradada para, com isso, obter a otimização dos processos de degradação de tais moléculas. A dificuldade para realização de tal proposta motivou a realização de estudos da degradação anaeróbia de proteínas.

Um melhor entendimento acerca dos processos de tratamento anaeróbio de águas residuárias é muitas vezes encontrado através do ajuste de modelos cinéticos aos dados experimentais. Esse ajuste permite em primeira instância a previsão de acúmulo de ácidos voláteis no reator e se constitui em importante ferramenta para a otimização do projeto de reatores. Muitos estudos têm sido realizados utilizando cinética de Monod, seus casos particulares (ordem zero e primeira ordem) e cinética de Andrews para a previsão de produção e consumo de ácidos voláteis (Vavilin & Lokshina, 1996).

Dessa forma, o presente trabalho enfocará a cinética de degradação das proteínas ou substâncias derivadas dessas moléculas presentes em efluentes fornecidos ao consórcio anaeróbio, suas principais rotas metabólicas de degradação, além da composição do biofilme presente no sistema, em cada etapa do processo. Com isso, pretende-se preencher uma lacuna existente na literatura, a respeito da degradação anaeróbia de proteínas em reatores com biomassa imobilizada, visando melhor elucidar as deficiências ainda existentes no tratamento anaeróbio de águas residuárias.

Capítulo 2

Objetivos

O presente trabalho possui como objetivos gerais a obtenção de parâmetros cinéticos do processo de degradação de proteínas, ou substâncias derivadas dessas moléculas, em reatores em escala de bancada, a inferência sobre as possíveis rotas metabólicas utilizadas pelo consórcio microbiano anaeróbio nesse processo, e a identificação morfológica dos microrganismos atuantes.

Como objetivos específicos tem-se:

- 1) A obtenção de parâmetros cinéticos aparentes da degradação anaeróbia de duas proteínas, caseína e soro-albumina e um hidrolisado protéico (separadamente). Essas substâncias constaram como única fonte de carbono no efluente sintético que alimentou o Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo (RAHLF) em escala de bancada.
- 2) Definir as possíveis rotas metabólicas de degradação desses substratos em RAHLF de bancada.
- 3) Identificar as bactérias envolvidas nas etapas de degradação anaeróbia desses substratos em RAHLF de bancada utilizando técnicas de microscopia ótica e eletrônica de varredura.
- 4) Obter os parâmetros cinéticos do processo de degradação anaeróbia das duas já citadas proteínas e do hidrolisado protéico presentes em efluentes sintéticos contendo também carboidratos e lipídeos com fontes de carbono, em RAHLF em escala de bancada.
- 5) Obter os parâmetros cinéticos de degradação anaeróbia das proteínas presentes em água residuária proveniente de abatedouro de aves em dois reatores em escala de bancada: um RAHLF e um reator UASB
- 6) Avaliar o teor residual de matéria orgânica e de proteínas efluente aos reatores utilizados nos processos estudados.

Capítulo 3

Revisão de Literatura

3.1. Proteínas

Segundo North & Atwood (1991), as proteínas, apesar de serem moléculas muito versáteis, são quimicamente muito simples. São polímeros formados por pequenas moléculas de L - α - aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Figura 3.1) , formando longas cadeias.

As estruturas dos L - α - aminoácidos são muito semelhantes entre si, sendo compostas por um átomo central de carbono, conectado por ligações covalentes a quatro diferentes átomos, ou grupos de átomos: um átomo de hidrogênio (- H), um grupo carboxílico (- COOH), um grupo amina (- NH₃) e um dos 20 tipos de radicais (- R) que diferenciam os L - α - aminoácidos entre si (North & Atwood, 1991).

Nas células, as proteínas são as moléculas orgânicas mais abundantes. Sua composição contempla: carbono (45%- 55%) hidrogênio (6% - 8%), oxigênio (19% - 25%), nitrogênio (14% - 21%) e, salvo raras exceções, enxofre (0% - 4%) (Sayed, 1987).

Nelson & Cox (2000) definem quatro níveis de estrutura da molécula de proteína. A descrição de todas as ligações covalentes (principalmente as ligações peptídicas e pontes dissulfeto) entre os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica é chamada de estrutura primária. O elemento mais importante da estrutura primária é a sequência de resíduos de aminoácidos. A estrutura secundária refere-se particularmente a arranjos estáveis dos resíduos de aminoácidos originando padrões estruturais (α -hélices, β -fitas, etc.). A estrutura terciária descreve todos os aspectos tridimensionais de um polipeptídeo (dobras, enrolamentos, etc.). Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades polipeptídicas, seu arranjo no espaço é referido como sua estrutura quaternária. A Figura 3.2 ilustra os quatro níveis estruturais presentes na molécula proteica.

Dependendo de sua conformação, as proteínas podem ser reunidas em três classes: proteínas fibrosas, insolúveis em água ou soluções de sais diluídos e dificilmente sujeitas à ação de enzimas proteolíticas; proteínas globulares, solúveis em sistemas aquosos, e em sua maioria, sujeitas à quebra de sua estrutura devido à ação de enzimas proteolíticas; e conjugadas, proteínas combinadas com substâncias não protéicas (chamadas grupos prostéticos) como lipídeos, ácidos nucleicos, carboidratos, metais e outros. As propriedades das proteínas conjugadas como solubilidade e suscetibilidade à quebra por ação enzimática, além de suas funções biológicas, são variáveis em função do grupo prostético (Sayed, 1987 e Nelson & Cox, 2000).

Segundo McInerney (1988), a presença de pontes dissulfeto nas moléculas de proteínas é um fator determinante nos processos de hidrólise protéica, etapa tida como limitante na degradação biológica desse substrato. Sabe-se que a presença de tais estruturas dificulta mais o processo do que a insolubilidade das moléculas, como anteriormente se acreditava.

3.1.1. Métodos de medida da concentração de proteínas e seus subprodutos em águas residuárias.

Segundo Raunkjaer *et al.* (1993), a escolha do método mais apropriado para a medida da concentração de proteínas presente em uma água residuária não se constitui em tarefa trivial, já que nenhum dos métodos existentes é ideal para tanto. Considerando os requerimentos de sensibilidade e especificidade protéica, a escolha provavelmente será entre os métodos de Bradford e de Lowry. A variabilidade de resposta apresentada pelo método de Bradford, de acordo com a proteína mensurada, torna-o mais indicado para a medida de concentração de proteínas puras e não de mistura delas como normalmente são encontradas em esgotos sanitários.

O fato do método de Bradford quantificar somente estruturas protéicas com mais de 8 ligações peptídicas, seria uma vantagem sobre o método de Lowry, quando se deseja saber acerca do tempo necessário para a hidrólise (ao menos parcial) de uma proteína, já que o segundo método quantifica, como proteínas, até os dipeptídeos. Todavia, para águas cujas concentrações protéicas são muito elevadas, o método de Bradford iria requerer diluições que poderiam resultar em erros.

Após vários testes, inclusive variando as proteínas utilizadas como padrão, Raunkjaer *et al.* (1993) concluíram que o método de Bradford ocasiona uma grande sub-estimativa da concentração protéica e o método de Lowry, uma pequena sobre-estimativa, o

que o torna mais apropriado para a medida da concentração de proteínas em águas residuárias. No entanto, os autores ressaltam que o método de Lowry é mais sensível a outros compostos presentes em águas residuárias (como lipídeos, por exemplo), e que se tais concentrações forem variáveis, sua intervenção deve ser investigada com cuidado.

3.2. Degradação Anaeróbia de Proteínas

A degradação anaeróbia de proteínas é importante na natureza para a reciclagem de nitrogênio e carbono. Águas residuárias contendo elevado teor protéico têm sido freqüentemente tratadas em reatores anaeróbios (Sayed, 1987).

Tommaso (1999) realizou estudos preliminares sobre a degradação anaeróbia de gelatina em reator anaeróbio diferencial de leito fixo, preenchido por espumas de poliuretano. Enfocou à cinética de consumo de substrato e aspectos da evolução microbiológica da biomassa aderida ao leito fixo. Concluiu que o modelo de primeira ordem representou melhor o processo de consumo de substrato e que os microrganismos encontrados com maior freqüência eram provavelmente proteolíticos fermentativos e metanogênicos hidrogenotróficos.

Segundo McInerney (1988), nos biodigestores anaeróbios, assim como no trato intestinal de animais, os microrganismos responsáveis pela degradação protéica são um grupo especializado que realiza tal tarefa para obter energia. Para tanto, as proteínas são inicialmente hidrolisadas a peptídeos, e esses, a aminoácidos. Nessa etapa do processo, dois grupos de enzimas microbianas são necessários, as proteases, que hidrolisam as proteínas a peptídeos, e as peptidases, que os quebram em aminoácidos (Schelegel, 1981¹, apud Sayed, 1987).

A ação das enzimas proteolíticas é evidenciada em digestores anaeróbios, pela determinação da atividade de tais compostos, que após serem liberados pelas bactérias, permanecem presentes no meio. Segundo Sayed (1987), os fatores que afetam a hidrólise enzimática das proteínas são a especificidade enzimática, a conformação das proteínas, as concentrações de substrato e de enzimas, pH e temperatura ambiente, o tempo de contato, além da presença de substâncias inibitórias. A solubilidade das proteínas vem sendo citada como fator limitante na hidrólise protéica, pelo fato de, na maioria dos casos, proteínas mais solúveis serem mais facilmente hidrolisadas. Todavia, nem sempre é possível relacionar a solubilidade com facilidade de hidrólise. Algumas vezes, proteínas menos solúveis são

¹ Schelegel, H. G. (1981). *Allgemeine mikrobiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, F.R.G.

hidrolisadas mais facilmente, como é o caso da caseína, em relação à ovoalbumina e albumina (mais solúveis, porém degradadas com maior dificuldade) (McInerney, 1988).

De acordo com McInerney (1988), após a etapa de hidrólise, os aminoácidos são rapidamente fermentados, originando ácidos voláteis de cadeias curtas, nitrogênio amoniacal e dióxido de carbono, por bactérias acidogênicas fermentativas.

A degradação anaeróbia de aminoácidos envolve reações de oxi-redução entre um ou mais aminoácidos, ou mesmo entre tais compostos e moléculas não nitrogenadas derivadas dos aminoácidos. As reações de oxidação são similares, se não idênticas, às que ocorrem através de bactérias aeróbias. Porém, obviamente, reações envolvendo oxidantes tão poderosos quanto o oxigênio não são observadas em ambientes anaeróbios. Assim, desaminações, transaminações e α - ceto oxidações são as reações de oxidação responsáveis pela fermentação de aminoácidos (McInerney, 1988).

As reações redutivas encontradas na fermentação anaeróbia de aminoácidos são muito distintas das encontradas em ambientes aeróbios. Os aceptores de elétrons mais encontrados são: aminoácidos, α e β -cetoácidos e suas coenzimas A derivadas, além de outros prótons. Os produtos originados mais freqüentemente são ácidos orgânicos de cadeias curtas, succinato, δ - aminovalerato e hidrogênio (Sayed, 1987).

Um único aminoácido resultante da hidrólise protéica é degradado especificamente e pode originar vários ácidos voláteis, como é o caso da fermentação da alanina que, além de produzir nitrogênio amoniacal e dióxido de carbono, dá origem a acetato e butirato (Sayed, 1987).

Muitas bactérias podem obter energia por meio de reações de oxi-redução envolvendo pares de aminoácidos. Estas são as chamadas reações de Stickland, através das quais um membro do par é oxidado enquanto o outro é reduzido. A alanina, quando oxidada pela glicina, é um bom exemplo de reações de Stickland, sendo que, nesse caso, o único ácido originado é o acético (McInerney, 1988).

3.3. Degradação Anaeróbia de Águas Residuárias Ricas em Proteínas – Estado Da Arte

Muitos estudos de natureza tecnológica são encontrados na literatura a respeito da degradação anaeróbia de águas residuárias com elevados teores protéicos. A conclusão normalmente apresentada é que a proteína, na maioria das vezes, é passível de degradação anaeróbia, porém a presença de outras frações orgânicas como carboidratos e lipídeos influenciam (positiva ou negativamente) no processo global de remoção da matéria orgânica

em águas residuárias. Alguns trabalhos julgados mais relevantes para o presente estudo serão apresentados a seguir.

Vidal *et al.* (2000) estudaram a influência do conteúdo de gorduras e proteínas na degradação de águas residuárias de indústrias de laticínios, cujos maiores constituintes apresentados eram: lactose, gorduras e proteínas. Os autores compararam dois meios sintéticos simulando água residuária de laticínios com variação no conteúdo de lipídeos, em reatores de batelada. A faixa de DQO utilizada foi de 3000 mg. l^{-1} – 5000 mg. l^{-1} . Nessa faixa de concentração não foram detectados problemas de flotação, e além disso, obteve-se máxima biodegradabilidade e metanização. Ao final do trabalho, foi observado que a degradação do meio com maior concentração de lipídeos foi a mais lenta, pois a taxa de hidrólise de tais moléculas é menor. Todavia, o ocorrido preveniu o acúmulo de ácidos voláteis, e o processo, como um todo, melhorou. Os intermediários da degradação de lipídeos não atingiram concentrações inibitórias e a concentração de amônia causou problemas somente nos meios com menor concentração de lipídeos.

Perle *et al.* (1995) realizaram estudos sobre alguns aspectos bioquímicos da degradação anaeróbia em água residuária de laticínios com objetivo de avaliar a influência de alguns compostos relevantes, como a caseína, a gordura do leite, e seus intermediários de degradação, na eficiência global do processo. Foram utilizados reatores em batelada, alimentados com efluente sintético simulando água residuária de laticínios. Os autores concluíram que a atividade enzimática responsável pela degradação da caseína é praticamente extracelular e que microrganismos previamente adaptados degradaram a molécula com velocidade muito maior do que os não adaptados. Os aminoácidos não apresentaram efeito inibitório para o processo. A degradação desses compostos não requisiu adaptação prévia por parte dos microrganismos. A biomassa, incluindo as arqueas metanogênicas, sofreu efeito inibitório pela presença de gorduras em concentração superior a 250 mg. l^{-1} , principalmente devido à geração de ácidos graxos de cadeias longas, oriundos de 80% da hidrólise das moléculas de gordura. O Glicerol, outro produto da degradação dos lipídeos, não causou inibição na concentração estimada pelos autores (50% dos lipídeos presentes inicialmente).

Ruiz *et al.* (1997) estudaram o tratamento anaeróbio de água residuária proveniente de abatedouro. Os autores caracterizaram vários despejos sem remoção prévia de sangue, que, portanto, continham elevado teor protéico (chegando a alcançar 70% do total de matéria orgânica) e elevada concentração de matéria orgânica (por volta de 8000 mg . l^{-1}). A biodegradabilidade desses despejos foi avaliada em dois tipos de reatores, um UASB e um

filtro biológico. Os autores concluíram que o UASB demonstrou melhor desempenho que o filtro biológico, que foi mais sensível às concentrações elevadas de matéria orgânica. Foram encontradas eficiências da ordem de 75% e elevados teores de nitrogênio amoniacal ($461 \text{ mg.l}^{-1} - 980 \text{ mg.l}^{-1}$) devido à degradação de proteínas em ambos os reatores. Em virtude dessas concentrações, não houve necessidade de controle externo de pH.

Estudos realizados por Breure *et al.* (1986) demonstraram que a degradação anaeróbia de proteínas é retardada pela presença de carboidratos como segunda fonte de carbono no meio. Os autores concluíram que, para a otimização do desempenho de sistemas de biodigestão anaeróbia de tratamento de águas residuárias contendo proteínas e carboidratos, a fermentação dos carboidratos e a hidrólise e fermentação de proteínas devem ocorrer em ambientes diversos. Essa hipótese é também reforçada por Martins *et al.* (1991) que, estudando os processos de acidificação de gelatina, caseína e ovoalbumina, concluíram que tais processos exigem tempos de residência superiores aos observados para carboidratos. Os autores observaram, ainda, que as velocidades de degradação de proteínas dependem de suas complexidades.

3.4. Bactérias Proteolíticas

As bactérias proteolíticas constituem um grupo especializado de microrganismos responsáveis pela degradação de proteínas. Os reatores anaeróbios contêm um grande número de bactérias proteolíticas (aproximadamente $6,5 \times 10^7 / \text{ml}$), sendo as do gênero *Clostridium* (gram positivas) as mais encontradas (McInerney, 1988).

Segundo dados obtidos por Siebert & Torien (1968), após incubação de 7 dias de material proveniente de lodo de tratamento de esgotos domésticos, em meio composto por mistura de ácidos voláteis como fonte de carbono, a maior parte das bactérias presentes nesses ambientes eram proteolíticas. Dentre elas, as espécies mais encontradas foram do gênero *Clostridium*. O segundo maior grupo de bactérias proteolíticas observado foi constituído por *Peptococcus anaerobios*. Contudo, essa linhagem foi citada pelos autores como fracamente proteolítica.

Madigan *et al.* (1997) também citam as bactérias pertencentes ao gênero *Eubacterium*, como espécies importantes na degradação anaeróbia de proteínas. Esses microrganismos são anaeróbios obrigatórios e produzem uma mistura de ácidos orgânicos, que inclui ácidos butírico, acético, fórmico e láctico, a partir do metabolismo de compostos como os aminoácidos.

Segundo Blackburn & Hobson (1962), outras bactérias com possibilidade de participação do processo de degradação anaeróbia de proteínas são pertencentes aos gêneros *Staphilococcus*, *Streptococcus* e *Bacterioides*, este último agrupando pelo menos nove espécies degradadoras de gelatina (Schleifer, 1984).

3.5. Filmes microbianos

Biofilmes microbianos são construídos quando organismos unicelulares unem-se formando uma comunidade fixa à uma matriz sólida revestida por polímeros extracelulares (Mah & O' Toole, 2001)

De acordo com Sutherland (2001), o biofilme é um ambiente dinâmico, onde células microbianas encontram-se otimamente organizadas para a utilização de todos os nutrientes disponíveis, a fim de encontrar homeostase. Os maiores componentes das matrizes são as próprias células microbianas, polissacarídeos e água (provavelmente mais de 97%), juntamente com produtos de excreção celular.

Os sistemas compostos por biofilmes possuem várias vantagens sobre as unidades com crescimento planctônico, incluindo a habilidade de conter uma grande variedade microbiana em vários locais dentro da matriz, possibilitando a degradação de substratos orgânicos diferentes, simultaneamente. Essa habilidade permite a formação de nichos biológicos, promovendo a estabilidade de microrganismos que não sobreviveriam em sistemas de crescimento suspenso completamente misturados. Por exemplo, o processo de degradação em água residuária contendo mistura de poluentes convencionais e xenobióticos em um sistema de crescimento suspenso não permitiria o crescimento lento de microrganismos capazes de degradar a fração tóxica. Nesses sistemas, esses seres não seriam competitivos em relação aos microrganismos de crescimento rápido, que degradam a fração convencional. Todavia, em sistemas compostos por biomassa imobilizada, o composto xenobiótico pode difundir através da profundidade do biofilme, onde os microrganismos de crescimento lento podem encontrar estabilidade para degradá-lo, enquanto os componentes convencionais são removidos próximos à superfície do biofilme (Bishop, 1997).

A estrutura física e biológica dos biofilmes é variável devido às múltiplas influências intrínsecas (células microbianas presentes e suas atividades fisiológicas) e a fatores ambientais (nutrientes disponíveis, pH, entre outros). Muitas das propriedades físicas dos biofilmes podem ser atribuídas às suas respectivas matrizes de polímeros extracelulares (Jenkinson & Lappin-Scott, 2001 e Sutherland, 2001).

Araújo (1995) concluiu que a produção de polímeros extracelulares está relacionada com a temperatura de operação do processo e com as concentrações de nitrogênio e de carboidratos do meio.

Campos (1992), operando reator de leito fluidificado, com areia como material suporte, observou que, quando eram aplicadas elevadas concentrações de carboidratos, biopartículas previamente formadas (areia + biofilme) aglutinavam-se, produzindo novas partículas muito maiores, com até 1,0 cm. Nessas biopartículas, foram observados diversos grãos de areia totalmente envolvidos por biomassa constituída por polímeros extracelulares e por microrganismos. Aparentemente, essas formações ocorreram, quase que essencialmente, fundamentadas na elevada produção de polímeros extracelulares, provocada pela presença de carboidratos em grande concentração e pela deficiência de nitrogênio.

Segundo Costerton *et al.* (1986), a adesão dos microrganismos às superfícies inertes e, mais propriamente, a eles mesmos, está ligada à produção de uma estrutura celular chamada de glicocálix. Esta estrutura é uma extensão da superfície celular (na verdade, a parte funcional dessa superfície) produzida através de uma seqüência multienzimática controlada, na qual há gasto energético por parte dos microrganismos. Esse componente celular é formado por polissacarídeos, cuja constituição química varia de acordo com a espécie em questão. A adesão dos microrganismos entre si parece ser função da afinidade existente entre tais estruturas.

É importante ressaltar que filmes microbianos possuem mecanismos mais efetivos de resistência a situações adversas do que os utilizados por células livres. Os microrganismos presentes em biofilmes são mais resistentes à exposição a componentes tóxicos, devido à composição multicelular das matrizes e aos sistemas de cooperação presentes nessa população microbiana (Stewart, 2001). Mah & O'Toole (2001) afirmaram que a estrutura física e/ou química dos exopolissacarídeos ou outros aspectos da arquitetura do biofilme, como sua heterogeneidade, poderiam também conferir aos microrganismos resistência a tóxicos, mantendo-os separados de tais substâncias. Segundo Bishop (1997), a característica de proteger os microrganismos pode ser atribuída ao glicocálix.

De acordo com Bishop (1997), biofilmes são muito mais heterogêneos do que se acreditava, sendo caracterizados por gradientes de tipos celulares e de parâmetros físico-químicos. Como resultado desses gradientes espaciais, as espécies e densidades microbianas, a porosidade e a tortuosidade do biofilme modificam-se ao longo de sua profundidade. Essa distribuição espacial dos componentes bióticos e abióticos das matrizes afeta os mecanismos de transferência de massa e a difusividade de substrato nos biofilmes. Além dessa

estratificação ao longo da profundidade, existem muitas evidências de que alguns biofilmes crescem com formatos muito mais heterogêneos possuindo estruturas altamente canalizadas.

Wimpenny *et al.* (2000) relacionaram três tipos de biofilmes a diferentes concentrações de substrato disponível. Biofilme plano e homogêneo encontrado em ambientes cujas concentrações de substrato são da ordem de 100 g.l^{-1} , como nos ambientes orais onde se desenvolvem placas bacterianas ao redor dos dentes. O segundo tipo é chamado de modelo do mosaico heterogêneo. Esse tipo de biofilme é encontrado em ambientes com concentrações de substrato infinitamente pequenas como nas tubulações de água potável, sendo descrito como pilhas compostas por microcolônias de organismos envolvidas por polímeros extracelulares formando colunas circundadas por uma fase líquida onde também podem ser encontrados protozoários. Em concentrações intermediárias de substrato, como as encontradas nos reatores anaeróbios de tratamento de águas residuárias, pode-se encontrar o terceiro modelo proposto, com estruturas semelhantes a cogumelos, contendo canais em sua parte superior, por onde a fase líquida se encontra livre para permeá-las, proporcionando assim, a existência de um fluxo molecular com substratos, nutrientes, ou aceptores de elétrons.

De acordo com os mesmos autores, o estudo de filmes microbianos utilizando técnicas como microscopia confocal a laser, microeletrodos e outras, aliado a modelos matemáticos bem formulados, deve sustentar a teoria de que não apenas células, mas também biofilmes, desenvolvem ciclos periódicos de vida.

3.6. Sistemas de Biomassa Fixa

Segundo Campos (1992), uma das maiores contribuições à evolução dos processos biológicos para tratamento de águas residuárias se deve ao aprendizado crescente de técnicas de imobilização e retenção de bactérias, quer na forma de grânulos, flocos ou agregados, quer na forma de biofilmes aderidos a suportes inertes.

Os sistemas que utilizam a imobilização e retenção de bactérias fundamentam-se no princípio da imposição de tempo médio suficientemente grande de retenção celular no interior do reator (obtendo-se, dessa maneira, a maior concentração admissível de microrganismos), para que se possa explorar o máximo possível de suas potencialidades naturais (Campos, 1992).

Speece (1996) afirma que a elevada capacidade de retenção de sólidos apresentada pelos sistemas de biomassa fixa contribui para a não ocorrência do arraste de células dos

reatores, além de ser particularmente favorável à adaptação dos microrganismos expostos à toxicidade crônica.

Várias são as configurações de reatores com retenção de biomassa em forma de biofilme utilizadas nos sistemas de tratamento biológico de despejos, podendo ser destacados os filtros biológicos, os reatores de leito fluidificado e expandido e o reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF), desenvolvido por Zaiat (1996). O RAHLF é um reator tubular preenchido por espumas de poliuretano, cuja configuração tem como objetivo o aumento do volume útil reacional do reator, em consequência da redução do volume destinado à separação do gás gerado no processo.

Existem inúmeras alternativas para a escolha de materiais suporte para biofilmes. Segundo Huysman *et al.* (1983), é provável que a rugosidade, a porosidade e o tamanho dos poros afetem a velocidade da colonização microbiana do suporte. Todavia, Campos (1994) ressalta que, passada a primeira fase da colonização microbiana, as características de adesão do suporte têm sua importância diminuída.

Dentre os vários meios suportes passíveis de utilização nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias, os poliuretanos formam um grupo de material plástico cujas propriedades mostram características muito interessantes como: densidade, tamanho de partícula e velocidade de sedimentação, passíveis de variações, elevada porosidade interna, grande estabilidade à hidrólise; e não biodegradabilidade (Pascik, 1990).

3.7. Cinética em Biofilmes

A utilização de critérios empíricos em projetos e simulações de reatores contendo células imobilizadas pode resultar em erros de projeto e em unidades sub-otimizadas. Entretanto, a obtenção de parâmetros fundamentais, que permitam a utilização de critérios racionais para projeto de tais unidades, é pouco estudada (Zaiat, 1996). Dentre os diversos modelos passíveis de desenvolvimento para a obtenção dos parâmetros racionais para projeto, são de muito interesse os modelos cinéticos, pois estão fundamentados na cinética das reações celulares presentes no processo, e nas relações entre as populações microbianas presentes nos sistemas (Lobos *et al.*, 1998).

O estudo da cinética dos processos ocorrentes no interior de um biofilme é extremamente importante, pois dela depende a evolução do mesmo e, dessa evolução, depende o desempenho do sistema em geral. Esse estudo está relacionado com o fluxo de substratos para o seu interior e o refluxo dos produtos. A dificuldade de tal estudo aumenta quando são considerados fenômenos como competição, simbiose e natureza da cadeia

alimentar. Tais fenômenos ocorrem devido à presença, em um mesmo biofilme, de microrganismos que utilizam o mesmo substrato, que necessitam da ação simultânea de outros microrganismos, ou ainda, que exigem ambientes completamente diversos entre si (Campos, 1992).

De acordo com Zaiat (1996), deve-se considerar as contribuições dos fenômenos de transferência de massa e das reações bioquímicas no estudo de parâmetros cinéticos para a melhor avaliação da eficiência de um processo, pois é fato sabido que os parâmetros cinéticos variam, tanto de acordo com a população estudada, quanto em função de características de retenção de biomassa e hidrodinâmicas de cada reator.

Droste & Kennedy (1986) afirmaram que, para a avaliação da influência dos fenômenos de transferência de massa em biorreatores, é necessário considerar a resistência à transferência de massa nas fases sólida e líquida, e que a velocidade global de reação depende da difusividade de cada reagente envolvido e das afinidades microbianas em relação a cada um deles. Os autores avaliaram a utilização sequencial de substrato e o fator de efetividade em filmes fixos presentes em processos anaeróbios. A conclusão do trabalho foi que a produção de substratos intermediários melhora a conversão do substrato primário para o produto final, além do que, ao longo do processo, em alguns casos, há uma significativa mudança no valor do fator de efetividade, já que a produção de intermediários implica na mudança das características físicas do fluido em escoamento pelo reator.

Considerando a produção de intermediários, Lobos *et al.* (1998) desenvolveram um modelo cinético para a digestão anaeróbia de resíduos sólidos em função dos balanços de massa dos principais substratos presentes e das principais populações microbianas envolvidas. Os ensaios foram realizados em reatores do tipo batelada com os seguintes substratos: glicose, acetato, propionato e butirato. O modelo proposto levou em conta a cinética particular de cada população microbiana envolvida. Dessa forma, o modelo cinético do tipo Monod foi ajustado para as populações acidogênicas, (de propionato e butirato) e metanogênicas hidrogenotróficas. Já para as populações metanogênicas acetoclásticas, foi ajustado modelo cinético com inibição pelo substrato, devido ao fato da população metanogênica ser afetada negativamente pela presença de acetato em excesso. O trabalho não levou em consideração as interações simbióticas entre as populações microbianas, já que foi realizado em frascos distintos, e os valores dos parâmetros estimados são aparentes, porém os autores julgaram a metodologia aplicável para a caracterização de lodo de um reator específico.

Conceitos convencionais considerando a estrutura interna dos biofilmes encontrados nos processos de tratamento de águas residuárias têm sido recentemente colocados em questão. A maioria dos modelos cinéticos existentes considera que o escoamento de substrato através do biofilme ocorre unidirecionalmente de forma perpendicular à matriz em questão. Todavia, existem muitas evidências indicando que biofilmes maduros devem ser adequadamente considerados como matrizes de crescimento contínuo, apesar de sua heterogeneidade, estratificadas ao longo de sua profundidade, podendo, dessa forma, ser modelados. Faz-se necessário considerar que pelo menos alguns tipos de biofilmes são mais heterogêneos do que se pensava, com estrutura interna caracterizada pela existência de grande número de canais em seu interior, o que, obviamente, interfere significativamente na obtenção de parâmetros cinéticos no interior das matrizes microbianas (Bishop, 1997).

Segundo Lewandowski *et al.* (1994), devido à estrutura extremamente heterogênea dos filmes microbianos, é preciso rever o que realmente representa o coeficiente de difusividade estimado em biofilmes, que controla a velocidade de reações metabólicas no interior dos mesmos, e se encontra inevitavelmente presente nos modelos de penetração de substrato. Para a determinação da cinética no interior dessas matrizes, os autores utilizaram uma metodologia baseada na utilização de micro-sensores localizados ao longo do biofilme. Eles permitem a realização de medições *in situ* com a estrutura do filme conservada. Os autores concluem, entre outras coisas, que tanto a hidrodinâmica, como a cinética nos sistemas compostos por biofilmes, estão intimamente ligadas ao fato de que a maioria das reações processadas em seus interiores é limitada pela difusão do substrato. Conseqüentemente, os gradientes de concentração são função não só da difusividade molecular, mas também dos fenômenos convectivos. O aperfeiçoamento da técnica utilizando micro-sensores está relacionado com a diminuição do tamanho dos mesmos, representando um excelente caminho para se desvendar os mecanismos cinéticos presentes no interior de um biofilme.

Zaiat & Foresti (1997) estudaram um método para a estimativa de parâmetros cinéticos em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF). Os autores estimaram parâmetros cinéticos intrínsecos e aparentes da decomposição do substrato através de perfis de demanda química de oxigênio e ácidos voláteis ao longo do comprimento do reator horizontal. O reator utilizado foi construído em escala de bancada, com comprimento de 1,0 metro, volume total de 1991 ml, e quatro pontos de amostragem ao longo de seu comprimento. O substrato utilizado foi glicose e o modelo cinético de primeira ordem foi o que melhor descreveu os dados experimentais. Ao final do trabalho, foi concluído que o

método utilizado demonstrou a possibilidade da utilização de dados extraídos de um RAHLF em operação sob limitações de transferência de massa, para a estimativa de parâmetros cinéticos de utilização de substrato. Todavia, a acuracidade do método irá depender da disponibilidade de correlações que providenciem reais valores de coeficientes de transferência de massa.

3.8 Considerações Finais

Dentro deste contexto, torna-se claro que o tratamento anaeróbio de águas residuárias com elevado teor de proteínas é, além de possível, extremamente viável. Os benefícios da utilização de tecnologias anaeróbias para o tratamento de despejos são claros, e tais processos tendem a ser cada vez mais aplicados. Todavia, acredita-se que melhores eficiências do processo podem ser obtidas caso se compreenda melhor os mecanismos envolvidos na utilização dos substratos, assim como na produção de metabólitos, apesar de se saber que o controle do processo se dá muito mais por mecanismos intrínsecos do que por ações externas. A tentativa de relacionar a cinética de consumo de substrato e produção de intermediário, com as possíveis rotas metabólicas e os microrganismos envolvidos, pode ser de grande valia quando se pretende elucidar algumas questões ainda desconhecidas. Acredita-se que, obviamente, não será possível colocar ponto final em questão alguma, dados seus graus de complexidade, todavia, com o presente trabalho, pretendeu-se contribuir com um pouco mais de luz, nesse ainda tão pouco explorado mundo dos tratamentos anaeróbios de despejos.

Capítulo 4

Materiais e Métodos

4.1. Desenho Experimental

4.1.1. Ensaio para estimativa de parâmetros cinéticos aparentes da degradação anaeróbia de proteínas presentes em efluentes sintéticos

Operou-se um RAHLF em escala de bancada alimentado com efluente sintético a base de duas proteínas e um hidrolisado protéico ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$) até ser atingido o estado de equilíbrio dinâmico (aproximadamente 30 dias). Nesse período, as concentrações de DQO, ácidos voláteis e alcalinidade (método titulométrico), além do pH do efluente e afluente do reator, foram monitoradas aproximadamente 3 vezes por semana. Depois de atingida a estabilidade do processo, foram obtidos perfis de concentração de substrato e produtos metabólicos que permitiram a estimativa de parâmetros cinéticos aparentes de seu consumo e ou produção. Para tanto, foram retiradas amostras de efluente ao longo do reator e realizadas as seguintes análises: quantificação de proteínas, DQO, ácidos voláteis, nitrogênio amoniacal e pH. Como o escoamento nesse tipo de reator assemelha-se ao pistonado (De Nardi *et al.*, 1999), com tal procedimento teve-se o objetivo de determinar as possíveis rotas metabólicas principais de degradação dos substratos utilizados. Os resultados obtidos foram frutos de uma única amostragem, sendo que todas as análises foram realizadas em duplicata, com exceção das análises de cromatografia gasosa, cujos dados são provenientes de uma única amostra. Os perfis foram construídos com as médias dos resultados obtidos das análises. Não se realizou mais de uma amostragem pois no início da etapa experimental, quando se desejava realizar o experimento em triplicata, observou-se que o equilíbrio dinâmico dos reatores sofria interferências, e portanto a amostragem seguinte não seria significativa, sem que se esperasse um determinado período de adaptação. Dessa forma, optou-se pela não realização dos experimentos em triplicata ou duplicata, pois tal procedimento aumentaria muito o tempo necessário para a etapa experimental, o que significaria possível comprometimento no regime hidrodinâmico do reator devido ao

acúmulo de polímeros. Finda essa etapa, retiraram-se amostras (três matrizes de poliuretano) dos microrganismos nos pontos de amostragem, que foram analisadas no microscópio óptico, sob contraste de fase e fluorescência. As condições de operação do presente ensaios foram: tempo de detenção hidráulica (TDH) igual a 4 h e temperatura de operação igual a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo de detenção hidráulica foi determinado em ensaio preliminar que utilizou tempos de 8 h, 6 h e finalmente de 4 h.

Posteriormente, adicionaram-se carboidratos como fonte de carbono alternativa ao efluente sintético ($\text{DQO} = 550\text{ mg.l}^{-1}$) e repetiu-se o experimento descrito após um período de 10 dias para adaptação da biomassa (60 vezes o tempo de detenção hidráulica). Realizou-se também o mesmo experimento com adição de carboidratos e lipídeos ($\text{DQO} = 600\text{ mg.l}^{-1}$) e finalmente retornou-se a alimentação com efluente sintético contendo somente caseína, S.A.B. ou peptona como fonte de carbono, porém agora com DQO igual a 600 mg.l^{-1} . Após o término do experimento, foram retiradas matrizes de poliuretano contendo biomassa em 5 pontos distribuídos uniformemente ao longo do reator. Tais matrizes foram submetidas, então, à análise de microscopia eletrônica de varredura. Aos efluentes sintéticos utilizados, adicionou-se sempre 1 g.l^{-1} de bicarbonato de sódio. Essa quantidade foi definida como satisfatória para dissolução de caseína, proteína com baixa solubilidade em água a temperatura ambiente e pH igual a 7. A caseína é solubilizada facilmente quando, por troca iônica, recebe o sódio em lugar do cálcio originalmente presente em suas moléculas. Quando se realizou experimento semelhante com caseína, foram obtidas eficiências de remoção de matéria orgânica semelhantes a 95%, e portanto acreditou-se que a citada quantidade de sal não afetaria o processo. Com isso, para manter a mesma condição de alcalinidade afluente aos reatores em todos os experimentos, decidiu-se por utilizar a citada quantidade de sal. Quando se realizou experimento com efluente sintético contendo soro albumina bovina como fonte de proteínas, não foi notada nenhuma interferência negativa em relação a essa grande quantidade de sal adicionada, todavia o mesmo não ocorreu com a peptona, que mostrou baixíssimas eficiências de remoção de matéria orgânica em algumas condições de operação. Por razões posteriormente discutidas no item de resultados e discussão, optou-se pela repetição do experimento com quantidade de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l^{-1} , quantidade normalmente utilizada pelos pesquisadores desse laboratório na confecção de efluente sintético simulando esgoto sanitário. Além das análises microbiológicas comumente realizadas, ao final das três primeiras etapas do experimento realizado com efluente sintético a base de peptona com concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l^{-1} ,

realizou-se experimentos de hibridação *in situ* na biomassa presente ao longo do reator para quantificação de microrganismos pertencentes aos Domínios *Archaea* e *Eubacteria*.

Para a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes de degradação de substratos, foram colhidas amostras ao longo do reator anaeróbio horizontal de leito fixo, nas posições correspondentes a relação entre comprimento e diâmetro (L/D) de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20. Baseando-se nos resultados das análises realizadas nas amostras obtidas, foi proposto um modelo cinético de reações irreversíveis em série e paralelo de primeira ordem com dois produtos intermediários, o ácido acético e o propiônico. Outros ácidos foram encontrados nas amostras, porém nunca em concentrações significativas. O modelo está descrito posteriormente no capítulo de resultados e discussão. A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático resumindo o desenho experimental realizado nos ensaios de determinação de parâmetros cinéticos e inferência de rotas metabólicas do processo de degradação das duas proteínas e do hidrolisado protéico utilizados.

4.1.2. Ensaio comparativo entre um RAHLF e um reator do tipo UASB tratando água residuária proveniente de um abatedouro de aves.

Para a realização desse ensaio, operaram-se dois reatores, um RAHLF e um UASB, alimentados com o mesmo efluente, submetidos ao mesmo tempo de detenção hidráulica (10 h) baseado no volume total do reator, e às mesmas condições ambientais (temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Após 30 dias de operação, retiraram-se amostras nos pontos de amostragem dos dois reatores e avaliou-se concentração de matéria orgânica, proteínas, ácidos voláteis, carboidratos e nitrogênio amoniacal. Com os resultados das análises, construíram-se perfis de concentração, aos quais se ajustou um modelo de decaimento exponencial de primeira ordem. O modelo cinético de primeira ordem com reações em série e paralelo com dois produtos intermediários não pôde ser utilizado, pois não se quantificou concentração significativa de ácidos voláteis ao longo do processo. Com as amostras retiradas, realizou-se também análise de eletroforese em gel de poliacrilamida - Duodecil Sulfato de Sódio (SDS – PAGE) para a avaliação do processo de degradação de proteínas. Nos mesmos pontos de amostragem, retiraram-se amostras da biomassa com as quais realizaram-se as seguintes análises: microscopia óptica de contraste de fase e autofluorescência, microscopia de varredura, e Técnica de PCR e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE).

Figura 4.1. Esquema do desenho experimental realizado nos ensaios de estimativa de parâmetros cinéticos e inferência de rotas metabólicas do processo de degradação anaeróbia de proteínas ou derivados de sua hidrólise.

4.2. Descrição dos Reatores

4.2.1. Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo

O reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo em escala de bancada foi confeccionado em acrílico com comprimento de aproximadamente 1,0 m e diâmetro de aproximadamente 5,0 cm, o que significa uma relação entre o comprimento e o diâmetro (L/D) de aproximadamente 20. O volume total do reator era de 2 l, a porosidade do leito foi de aproximadamente 40%, o que resultou em volume útil de 800 ml. Ao longo do comprimento do reator, são dispostos amostradores em posições correspondentes a L/D de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 18, resultando em um total de onze pontos de amostragem, incluindo a entrada e a saída. O reator conta com dispositivo de coleta de gás na parte superior, acoplado a um selo hídrico de onde se retiravam amostras para análises cromatográficas, a fim de verificar a presença do gás metano. A Figura 4.1 apresenta um desenho esquemático do reator. O material utilizado para a composição do leito fixo do reator foi espuma de poliuretano, com densidade 23 Kg.m^{-3} (Edmil Indústria e Comércio Ltda). Esse material foi utilizado em forma de cubos com 5 mm de lado.

4.2.2. Reator UASB

O reator do tipo UASB utilizado no presente trabalho de pesquisa foi confeccionado também em acrílico, com secção quadrada, de aresta igual a 10 cm, e altura de aproximadamente 1,00 m, o que significa uma relação entre a aresta e o diâmetro (A/D) de aproximadamente 10, e volume de 10 l. Ao longo da altura do reator foram dispostos 4 amostradores nas posições 2, 4, 6, 8, o que resulta em 6 pontos de amostragem, incluindo entrada e saída. A parte superior do reator era composta por um sistema separador gás sólido líquido, acoplado a um selo hídrico, para seu correto funcionamento. Pela mangueira de ligação entre o reator e o selo hídrico, eram retiradas amostras de gás para análises de cromatografia e verificação da presença de gás metano. O volume ocupado pelo leito do reator, sem expansão da manta, era de 3,3 l e já se encontrava granulado quando foi adicionado.

4.3. Efluentes Sintéticos

Os efluentes sintéticos utilizados nos ensaios realizados com fins de estimativa de parâmetros cinéticos e inferências acerca das rotas metabólicas do processo de degradação

anaeróbia de substratos em RAHLFs foram compostos por duas proteínas, soro albumina bovina, e caseína, e um hidrolisado protéico, a peptona de carne bovina. Esses três compostos utilizados eram de procedência Sigma.

Para o balanceamento nutricional microbiano, os efluentes sintéticos continham também sais minerais de acordo com a Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição de sais minerais presentes nos efluentes sintéticos utilizados no experimento.

<i>Sais minerais</i>	<i>Concentração</i>
<i>Na₂PO₄·2H₂O</i>	420 mg. <i>l</i> ⁻¹
<i>NaCl</i>	250 mg. <i>l</i> ⁻¹
<i>MgCl₂·6H₂O</i>	7 mg. <i>l</i> ⁻¹
<i>CaCl₂·2H₂O</i>	4,2 mg. <i>l</i> ⁻¹

As fontes de carbono presentes nos efluentes sintéticos foram preparadas com água destilada e tinham a composição apresentada na Tabela 4.2.

Nos ensaios com efluentes à base de caseína e S.A.B., utilizou-se 1 g / *l*⁻¹ de bicarbonato de sódio para prover o meio de alcalinidade e também auxiliar na dissolução das moléculas de caseína. Nos ensaios com efluentes à base de peptona, foram utilizadas duas condições de alcalinidade: 400 mg.*l*⁻¹ e 1 mg.*l*⁻¹ de bicarbonato de sódio afluente.

Nos ensaios realizados com efluentes sintéticos a base de caseína, o efluente utilizado na última condição experimental (efluente sintético à base de caseína com DQO ~ 600 mg . *l*⁻¹) foi substituída por outro cuja única fonte de carbono também era constituída somente por proteína, porém com DQO semelhante a 400 mg.*l*⁻¹, e suplementação de 10 mg.*l*⁻¹ de sulfato ferroso. Nas duas primeiras condições de operação, o reator foi alimentado com substrato sintético com caseína como única fonte de carbono (DQO ~ 400 mg . *l*⁻¹), com tempos de adaptação do consórcio igual a 65 dias e 28 dias. Co tempo de adaptação igual à 65 dias, o reator operou 15 dias com tempo de detenção hidráulica igual a 8 horas, 15 dias com tempo de detenção hidráulica igual a 6 horas, e 35 dias com tempo de detenção hidráulica igual 4 horas

Tabela 4.2.: Fontes de carbono presentes nos efluentes sintéticos fornecidos ao RAHLF.

Efluentes sintéticos com S. A. B. como fonte de carbono única ou combinada			
Condição de operação	Fonte de carbono	Concentração (mg . l⁻¹)	DQO aproximada (mg . l⁻¹)
Condição 1	S.A.B.	350	400
Condição 2	S.A.B.	350	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
Condição 3	S.A.B.	350	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
	Óleo de soja	0,045 ml / l ⁻¹	50
Condição 4	S.A.B.	520	600
Efluentes sintéticos com peptona como fonte de carbono única ou combinada			
Condição 1	Peptona	341	400
Condição 2	Peptona	342	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
Condição 3	Peptona	342	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
	Óleo de soja	0,045 ml / l ⁻¹	50
Condição 4	Peptona	513	600
Efluentes sintéticos com peptona como fonte de carbono única ou combinada			
Condição 1, 2 e 5	Caseína	310	400
Condição 3	Caseína	310	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
Condição 4	Caseína	310	400
	Sacarose	50	150
	Amido	132	
	Óleo de Soja*	0,045 ml / l ⁻¹	50

* Cada 0,045 ml de óleo de soja foi emulsificado com 3 gotas de detergente Ipê Clear neutro.

4.4. Inóculo

O lodo utilizado no experimento foi proveniente de um reator anaeróbio estável, já em operação, com bons resultados de eficiência. O lodo utilizado no reator UASB já se encontrava granuloso. O procedimento de imobilização do lodo nas matrizes de poliuretano foi realizado de acordo com metodologia desenvolvida por Zaiat (1996). Essa técnica especifica que a espuma de poliuretano deve ser mantida em contato com a suspensão do lodo, previamente macerado (para a destruição de possíveis grânulos existentes) por duas horas. Decorrido esse período, as matrizes com células aderidas foram colocadas em contato com o efluente líquido para a lavagem de sólidos fracamente aderidos. Após a drenagem do líquido, as matrizes com os sólidos aderidos estavam prontas para serem introduzidas no reator. Em todos os ensaios, os microrganismos foram submetidos a quatro semanas de adaptação nas primeiras condições operacionais. Entre uma condição operacional e outra os microrganismos foram submetidos a, no mínimo, dez dias de tempo de adaptação.

4.5. Análises Físico-Químicas

4.5.1. Análises de monitoramento

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e alcalinidade foram realizadas seguindo métodos descritos por Greenberg *et al.* (1992) (Standard Methods for Water and Wastewater Examination, 1998). A quantificação de proteínas e derivados foi realizada segundo metodologia descrita por Lowry e modificada por Peterson (1987) devido a motivos apresentados por Raunkjaer *et al.* (1993). A quantificação de nitrogênio na forma amoniacal foi realizada pelo método de Kjeldahl. A determinação de ácidos voláteis foi realizada por cromatografia gasosa segundo metodologia descrita por Moraes *et al.* (2000).

4.5.2. Análise de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida - Duodecil Sulfato de Sódio (SDS – PAGE)

Esse ensaio foi realizado ao longo do reator em nove pontos de amostragem, devido ao aparato utilizado que continha 10 poços para disposição das amostras, sendo um deles destinado para o marcador de massa molecular. Com isso, descartou-se os pontos 6 e 4. A técnica utilizada foi descrita por Laemmli (1979). Nesse procedimento, as proteínas presentes nas amostras aplicadas no gel são separadas de acordo com sua massa molecular. Essa separação ocorre devido à ação do SDS, um detergente, que deixa a molécula positivamente carregada fazendo

com que sua migração pelo gel ocorra unicamente devido sua massa molecular. Moléculas de maior massa migram menos devido à resistência física apresentada pelos poros do gel. Inicialmente, transferiu-se 20 µl de amostra previamente filtrada em papel de filtro com poros de 1,2 µm para um eppendorf de capacidade de 1,5 ml, e adicionou-se às amostras 10 µl do tampão 1. Essa mistura foi submetida a fervura por 5 minutos. Essas etapas tiveram como objetivo o desnovelamento da molécula de proteína por ação da temperatura e do β-mercaptoetanol em suas pontes dissulfeto. O gel de poliacrilamida a 15% previamente preparado foi disposto na cuba e envolvido pelo tampão 2. Aplicou-se, nos poços do gel, 20 µl da mistura submetida à fervura. Inicialmente, aplicou-se na cuba uma diferença de potencial (ddp) de 90 V, para a penetração das amostras na parte superior do gel (gel de empilhamento), posteriormente aplicou-se uma ddp de 120 V por aproximadamente duas horas, até que o tampão que contém a amostra saísse do gel. O Gel então foi corado com Comansie Blue, por cerca de 15 minutos e posteriormente descorado por sucessivas lavagens em ácido acético 10%, até que se verifique transparência no gel e nitidez nas bandas presentes.

Composição do gel de empilhamento: 4,5% de poliacrilamida em solução 0,125 M de tampão Tris-HCl com pH 6,8.

Composição do gel de resolução: 15% de poliacrilamida em solução 0,25 M de tampão Tris-HCl com pH 8,8.

Composição do tampão 1: 125 mM Tris-HCl pH 6,8 / 10% 2-mercaptoethanol / 10% SDS / 10% glycerol, contendo uma pequena alíquota de corante bromofenol azul.

Composição do tampão 2: 196mM glycine / 0.1% SDS / 50mM Tris-HCl com pH 8,3.

Composição do corante: 0.2% CBB em 45:45:10 % metanol:água:ácido acético.

4.6. Análises Microbiológicas

4.6.1. Análise de microscopia eletrônica de varredura

As amostras para MEV foram submetidas à técnica desenvolvida por Nation (1983) e adaptada para biofilmes bacterianos por Araújo (1995).

Inicialmente, as amostras foram fixadas permanecendo em solução tampão fosfato com concentração 0,1 M (pH = 7,3), contendo 2,5% de glutaraldeído, durante 12 horas, na temperatura de 4°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três lavagens com duração de 10 minutos cada, com a solução tampão fosfato, e expostas a soluções de etanol a 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100% (3 vezes) durante 10 minutos a cada concentração, para desidratação. O

próximo procedimento foi a exposição das biopartículas por 30 segundos, à solução de hexametildesilazane (HMDS) para pós-fixação. As amostras foram, então, secas em estufa à temperatura de 60°C, durante duas horas e cobertas com ouro, para, finalmente, serem observadas ao microscópio eletrônico de varredura digital Zeiss DMS-960.

4.6.2. Análise de microscopia óptica

As amostras foram observadas ao microscópio óptico, sob contraste de fase e fluorescência, para visualização de culturas metanogênicas que possuem co-enzima F420. Para essas análises, a biomassa foi desprendida do material suporte e fixada em lâminas com agar a 1%.

4.6.3. Hibridação Fluorescente *In Situ* (FISH)

A técnica de hibridação fluorescente *in situ* (FISH) foi utilizada para a quantificação e caracterização dos microrganismos anaeróbios presentes no reator horizontal anaeróbio de leito fixo. A metodologia utilizada foi a mesma descrita em Domingues (2001).

• Sondas de oligonucleotídeos fluorescentes

As amostras foram hibridadas com sondas de oligonucleotídeos específicos ao RNAr 16S dos Domínios *Archaea* e *Bacteria*. As sondas utilizadas foram marcadas com o corante fluorescente rodamina, na extremidade 5'.

A sonda NON338, cuja sequência de nucleotídeos não se hibrida ao RNAr microbiano (Manz *et al.*, 1992), foi utilizada como controle negativo para quantificar as porcentagens de hibridações não específicas e de células autofluorescentes.

A sonda EUB338 foi utilizada para detectar organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* (Amann *et al.*, 1990). Finalmente, para o Domínio *Archaea* foi utilizada a sonda ARC915 (Raskin *et al.*, 1994). As especificidades das sondas, as sequências de bases dos oligonucleotídeos e posições de hibridação do RNAr 16S estão descritas na Tabela 4.3. As concentrações estoque e finais das sondas utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.3. Sondas de oligonucleotídeos utilizadas na hibridação *in situ*.

Sonda	Especificidade	Seqüência (5'→3')*	Sítio do RNAr 16S**
NON338	Controle Negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	338 - 355
EUB338	Domínio <i>Bacteria</i>	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	338 - 355
ARC915	Domínio <i>Archaea</i>	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	915 - 934

*Seqüência de bases obtidas por Amann *et al.* (1995).

** Numeração baseada no RNAr de *E. coli*, de acordo com Brosius *et al.* (1981).

• Preparação das amostras

Para cada ponto, estudado foram retiradas 3 matrizes de poliuretano, com auxílio de pinça estéril, transferidas para frasco de antibiótico contendo 2,5g de pérolas de vidro e 5,0mL de tampão salino fosfato (PBS: 130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM Na₂H₂ PO₄). Este sistema foi mantido sob atmosfera de nitrogênio e dióxido de carbono (70:30) por 5 minutos, submetido à agitação manual em ângulo de 45°C, durante 20 minutos, e agitado em vórtex por mais 5 minutos para adequada separação dos arranjos celulares. Após o desprendimento, as amostras foram acondicionadas, em duplicata, em tubos de microcentrífuga de 1,5mL para o procedimento de fixação.

• Fixação das amostras

Para a fixação, as amostras acondicionadas foram centrifugadas, sob refrigeração, durante 1 minuto a 9000rpm, lavadas duas vezes com o mesmo volume em PBS (10x); ressuspensas em 200µL de PBS (10x) mais 600µL de tampão de fixação com paraformaldeído 4%, por 14 horas a 4°C. Após esse período, as amostras foram lavadas 3 vezes, por 1 minuto, em PBS (10x) e 0,1% de detergente NONIDET P-40 e armazenadas a -20°C em tubos de microcentrífuga contendo 50% de etanol e 50% PBS (10x).

• Tratamento das lâminas de vidro

Para a realização da técnica de hibridação *in situ*, foram utilizadas lâminas de vidro (CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO.), revestidas com teflon, com 12 pocinhos de 7mm de diâmetro cada (Figura 4.2).

As lâminas foram mantidas em solução de hidróxido de potássio 10%, durante 40 minutos, enxaguadas com água destilada e secas em estufa a 45 °C (Domingues, 2001).

Figura 4.2: Lâmina de vidro revestida com teflon utilizada na hibridação *in situ*.

• Hibridação *in situ*

As amostras mantidas em 50% de etanol / PBS (1x) foram retiradas do freezer e homogeneizadas em agitador de tubos por 1 minuto. Com auxílio de pipeta automática, alíquota de 1 μ L de cada amostra foi espalhada sobre o pocinho da lâmina de vidro e subsequente colocada em forno de hibridação a 45°C, durante 20 minutos, para aumentar a adesão das células sobre a lâmina. Em seguida, as amostras foram desidratadas em séries gradativas de etanol 50%, 80% e 100%, durante 3 minutos cada.

Após a desidratação, as amostras foram cobertas com 9 μ L de tampão de hibridação pré-aquecido em temperatura específica e 1 μ L de sonda. As composições dos tampões de hibridação, de lavagem e as respectivas temperaturas de hibridação para cada sonda utilizada seguem o protocolo descrito na Tabela 2.

Após a hibridação, a lâmina com as amostras foi mergulhada e mantida em tubo Falcon contendo 50mL do respectivo tampão de lavagem. As temperaturas e tempos de lavagem específicos estão apresentados na Tabela 4.4. Em seguida, as lâminas foram lavadas suavemente com água destilada, para remoção dos sais, e secas a temperatura ambiente.

Tabela 4.4. Protocolos de hibridação.

Sondas	Temperatura de hibridação	Tampão de hibridação	Temperatura e tempos de lavagem	Tampão de lavagem
NON338	46°C por 1,5 h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225 mM NaCl
EUB338	46°C por 1,5 h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 15 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225 mM NaCl
ARC915	45°C por 2,0 h câmara úmida	0,9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 20% formamida	48°C por 20 minutos	20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,01% SDS (pH 7,2) + 225 mM NaCl

Fonte: Abe (1998), Hahn *et al.* (1992), Raskin *et al.* (1994), Domingues (2001).

Para a contagem total de células, as amostras foram coradas com 8 µL, por pocinho, de solução DAPI 10µg / mL (4',6-diamidino-2-fenil indol), durante 10 minutos, em temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida, a lâmina contendo as amostras foi lavada gentilmente com água destilada para remover o excesso do corante DAPI.

Para a observação e contagem das células, a lâmina foi montada com 1,4 µL de glicerol / PBS (80 / 20 v / v), em cada pocinho, coberta com lamínulas e observada em microscópio de fluorescência LEICA DMLB, usando filtros específicos para DAPI e rodamina. As imagens foram fotografadas e congeladas com sistema de câmera de vídeo digital Optronics com tempos de exposição de 0,08 segundo para contraste de fase e luz comum e entre 0,5 segundo e 4,0 segundos para epifluorescência. As microscopias de contraste de fase e de luz comum foram utilizadas para verificar a morfologia das células bem como identificar as partículas abióticas que, às vezes, apresentavam fluorescência sob luz ultravioleta.

Para a contagem das células, duas imagens foram congeladas e fotografadas, em mesmo campo microscópico, uma correspondente a excitação do DAPI, referente ao total de células, e a outra correspondente a excitação da rodamina, referente às células hibridadas com sondas específicas. Antes da contagem, as duas imagens foram sobrepostas para confirmar se as partículas coradas com rodamina eram realmente células hibridadas, ou seja, se correspondiam às células coradas com DAPI.

Para cada sonda e amostra foram contadas entre 800 e 1000 células coradas com DAPI em 20 a 25 campos microscópicos aleatórios. A porcentagem de células hibridadas com sondas específicas, em cada campo microscópico, foi calculada em relação ao total de células coradas com DAPI. Como método de contagem, cada filamento semelhante a *Methanosaeta* sp. foi considerado como uma única célula.

4.6.4. Técnica de PCR e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

Para se obter as amostras do material biológico do RAHLF, as espumas de poliuretano foram submetidas à maceração com bastão de vidro na presença de tampão biológico até que todo biofilme fosse desprendido. O biofilme, dessa forma ressuspenso, foi centrifugado e o pelete resultante serviu para a extração do DNA. As amostras do UASB sofreram maceração em pistilo e almofariz até atingir uma suspensão homogênea, que foi então centrifugada e o DNA extraído do pelete formado. Amostras de DNA foram obtidas com o método de extração descrito por Griffiths *et al* (2000). Resumidamente, as amostras são expostas a uma solução de fenol, clorofórmio e tampão, junto com a ação mecânica de ruptura celular por pérolas de vidro. As seqüências correspondentes ao gene que Decodifica o RNAr 16S foram amplificadas por PCR utilizando-se de *primers* específicos para os Domínios Archaea (KUDO *et al.*, 1997) e Bacteria (HEUER *et al.*, 1997). Os fragmentos de rDNA 16S foram então separados em gel de polyacrylamida com gradiente desnaturante (DGGE), permitindo a avaliação do perfil da diversidade de microrganismos nas amostras através do padrão de bandas obtidos (MUYZER *et al.*, 1993). Foi utilizado o formador de gradiente modelo 475 da BIO-RAD laboratories e a eletroforese foi realizada em corrente constante de 75 V a uma temperatura de 65°C por 16 h. Depois da eletroforese, o gel foi corado em IXTAE com brometo de etídio (0,5 µg . mL⁻¹). O gel foi fotografado com luz Ultra Violeta de onda curta no Eagle Eye II, Stratagene, utilizando o programa Eaglesight versão 3.2. A comparação do perfil de bandas foi realizada visualmente.

Capítulo 5

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos no presente trabalho de pesquisa. A apresentação dos mesmos se dará de acordo com os efluentes sintéticos utilizados em cada etapa experimental. A ordem de apresentação foi determinada pelo cronograma experimental desenvolvido, para que o leitor entenda determinadas atitudes tomadas ao longo do trabalho de Tese. Os itens estarão subdivididos em dois subitens:

- Modelagem e determinação de parâmetros cinéticos aparentes e
- Análises microbiológicas

5.1. Modelo Cinético

Baseando-se nos resultados das análises realizadas ao longo do RAHLF, foi proposto um modelo cinético fenomenológico de reações irreversíveis em série e paralelo de primeira ordem com dois produtos intermediários para os processos de degradação de efluente sintético. O modelo foi sugerido baseado em possíveis reações ocorrentes no interior do reator, de acordo com o diagrama apresentado na Figura 5.1.1, no qual k_1^{app} , k_2^{app} , k_3^{app} , k_4^{app} , k_5^{app} e k_6^{app} são as constantes cinéticas dos processos descritos. Para a proposição do modelo, partiu-se das seguintes hipóteses:

- 1) As reações no reator ocorriam segundo cinética de primeira ordem.
- 2) O reator possuía regime hidrodinâmico pistonado ideal (de Nardi *et al.*, 1999).
- 3) O modelo é pseudo-homogêneo, já que o reator foi considerado homogêneo, todavia possuía fases sólida e líquida. Com isso, os valores estimados para as constantes englobam tanto as reações bioquímicas ocorrentes, quanto os fenômenos de transporte envolvidos.

As equações 1 a 4 foram obtidas a partir do mecanismo proposto para representar a variação ao longo do reator das concentrações de proteínas, carboidratos, ácido acético e ácido propiônico, respectivamente, onde $r_{proteína}$ é a taxa de consumo de proteínas e derivados de hidrólise, $r_{carboidrato}$ é a taxa de consumo de carboidratos, $r_{acetato}$ é a taxa de produção e consumo de ácido acético e $r_{propionato}$ é a taxa de produção e consumo de ácido propiônico.

$$I_{proteína} = - (k_1^{app} + k_3^{app}) \cdot C_{BSA} \quad (1)$$

$$I_{carboidrato} = - (k_5^{app} + k_6^{app}) \cdot C_{CH} \quad (2)$$

$$I_{acetato} = k_1^{app} \cdot C_{BSA} + k_5^{app} \cdot C_{CH} + k_4^{app} \cdot C_{propionic} - k_2^{app} \cdot C_{acetic} \quad (3)$$

$$I_{propionato} = k_3^{app} \cdot C_{BSA} + k_6^{app} \cdot C_{CH} - k_4^{app} \cdot C_{propionic} \quad (4)$$

O sistema de equações de (1) a (4) foi resolvido, resultando nas equações de (5) a (8). Essas equações permitiram a estimativa das constantes cinéticas de consumo de substrato e produção de metabólitos a partir de um algoritmo de otimização, baseado na técnica dos

gradientes generalizados reduzidos (Microsoft Excel® 2000 - SOLVER). Apesar das concentrações de lipídeos não terem sido mensuradas devido a seu baixo valor (inferior a 50 mg / l), a aplicação do modelo não foi afetada por sua ausência, permitindo assim, a verificação do efeito da presença dessas moléculas no processo estudado.

Figura 5.1.1: Diagrama do modelo cinético de reações irreversíveis em série e paralelo de primeira ordem com dois produtos intermediários.

Dessa forma, as equações 5, 6, 7 e 8 representam, respectivamente, o consumo de proteínas e derivados, carboidratos e a produção e consumo dos ácidos propiônico e acético. Nessas equações, D é o diâmetro do reator, L seu comprimento, ϵ é a porosidade do leito, v_s é a velocidade intersticial do líquido, C_{BSA} é a concentração de proteínas e derivados, C_{BSA_0} é a concentração inicial de proteínas e derivados, C_{CH} é a concentração de carboidratos, C_{CH_0} é a concentração inicial de carboidratos, C_{acetic} é a concentração de ácido acético e $C_{propionic}$ é a concentração de ácido propiônico. Essas equações foram obtidas a partir de um balanço de massa no RAHLF.

$$C_{BSA} = C_{BSA_0} \cdot \exp\left(-\frac{(k_1 + k_3) \cdot D}{\epsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D}\right) \quad (5)$$

$$C_{CH} = C_{CH_0} \cdot \exp\left(-\frac{(k_5 + k_6) \cdot D}{\epsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D}\right) \quad (6)$$

$$\begin{aligned}
C_{\text{acetic}} = & C_{\text{BSA}_0} \cdot \frac{\left(k_1 + \frac{k_3 \cdot k_4}{k_4 - k_1 - k_3} \right)}{k_2 - k_1 - k_3} \cdot \left(\exp\left(-\frac{(k_1 + k_3)D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_2 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right) + \\
& + C_{\text{BSA}_0} \cdot \frac{C_{\text{BSA}_0} \cdot k_3 \cdot k_4}{(k_4 - k_1 - k_3)(k_2 - k_3)} \cdot \left(\exp\left(-\frac{k_2 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_4 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right) + \\
& + C_{\text{CH}_0} \cdot \frac{\left(k_5 + \frac{k_6 \cdot k_4}{k_4 - k_5 - k_6} \right)}{k_2 - k_5 - k_6} \cdot \left(\exp\left(-\frac{(k_5 + k_6)D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_2 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right) + \\
& + C_{\text{CH}_0} \cdot \frac{C_{\text{BSA}_0} \cdot k_6 \cdot k_4}{(k_4 - k_5 - k_6)(k_2 - k_6)} \cdot \left(\exp\left(-\frac{k_2 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_4 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right)
\end{aligned} \tag{7}$$

$$\begin{aligned}
C_{\text{propionic}} = & \frac{C_{\text{BSA}_0} \cdot k_3}{k_4 - k_1 - k_3} \cdot \left(\exp\left(-\frac{(k_1 + k_3)D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_4 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right) + \\
& + \frac{C_{\text{CH}_0} \cdot k_6}{k_4 - k_5 - k_6} \cdot \left(\exp\left(-\frac{(k_5 + k_6)D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) - \exp\left(-\frac{k_4 \cdot D}{\varepsilon \cdot v_s} \cdot \frac{L}{D} \right) \right)
\end{aligned} \tag{8}$$

5.2. Resultados dos Ensaios Utilizando Soro Albumina.

5.2.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.

Para a realização desse experimento, operou-se um RAHLF em escala de bancada em quatro condições diversas. Na primeira condição, o reator operou cerca de 28 dias alimentado com efluente sintético à base de S.A.B. com DQO média de 400 mg. l^{-1} , com produção de alcalinidade total em torno de 84,08 mg $\text{CaCO}_3.l^{-1}$. Na segunda condição, com adição de carboidratos ao efluente anterior, o reator foi operado cerca de 10 dias com produção de alcalinidade total por volta de 61,86 mg $\text{CaCO}_3.l^{-1}$. Na terceira condição, com adição de lipídeos ao efluente anterior, o reator foi operado por 10 dias com produção de alcalinidade total de 71,44 mg $\text{CaCO}_3.l^{-1}$. Finalmente na quarta condição, com efluente sintético a base de S.A.B. com DQO média de 600 mg. l^{-1} , o reator foi operado cerca de 10 dias com produção de alcalinidade total por volta de 99,21 mg $\text{CaCO}_3.l^{-1}$. A produção de alcalinidade total durante o tempo de operação das condições operacionais foi praticamente constante e, com isso, os processos foram considerados

estáveis e prontos para a realização do experimento de determinação de parâmetros cinéticos aparentes e inferência de rotas metabólicas da degradação anaeróbia de S.A.B.

Os resultados da aplicação do modelo cinético proposto para o RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$), S.A.B. e carboidratos, S.A.B. carboidratos e lipídeos e novamente S.A.B. ($DQO = 600 \text{ mg.l}^{-1}$) como fonte de carbono estão descritos nas Figuras 5.2.1 a 5.2.4. As constantes cinéticas fornecidas pelo modelo se encontram na Tabela 5.2.1. Os coeficientes de correlação (R^2) foram obtidos graficando-se os resultados obtidos experimentalmente, contra os preditos pelo modelo.

Figura 5.2.1. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$) como fonte de carbono: concentração de S.A.B medida experimentalmente (■), concentração de ácido acético medida experimentalmente (*), concentração de ácido propiônico medida experimentalmente (◆), valores preditos pelo modelo (—), $R^2 = 0,9857$.

Figura 5.2.2. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e carboidratos, e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono: concentração de S.A.B medida experimentalmente (■), concentração de carboidratos medida experimentalmente (●), concentração de ácido acético medida experimentalmente (★), concentração de ácido propiônico medida experimentalmente (◆), valores preditos pelo modelo (—), $R^2 = 0.9827$.

Figura 5.2.3. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e carboidratos, e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B., carboidratos e lipídeos como fonte de carbono: concentração de S.A.B medida experimentalmente (■), concentração de carboidratos medida experimentalmente (●), concentração de ácido acético medida experimentalmente (★), concentração de ácido propiônico medida experimentalmente (◆), valores preditos pelo modelo (—), $R^2 = 0.9838$.

Figura 5.2.4. Perfil de decaimento da concentração de proteínas e produção de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com S.A.B. (DQO = 600 mg.*l*⁻¹) como fonte de carbono: concentração de S.A.B medida experimentalmente (■), concentração de ácido acético medida experimentalmente (★), concentração de ácido propiônico medida experimentalmente (◆), valores preditos pelo modelo (—). R² = 0.9857.

Tabela 5.2.1: Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando S.A.B. como fonte de proteínas nos efluente s sintéticos fornecidos ao RAHLF.

	$k_1^{app} (h^{-1})$	$k_2^{app} (h^{-1})$	$k_3^{app} (h^{-1})$	$k_4^{app} (h^{-1})$	$k_5^{app} (h^{-1})$	$k_6^{app} (h^{-1})$
Fonte de carbono						
S.A.B. (DQO 400 e 600						
mg. <i>l</i> ⁻¹)	0,16	0,92	0,02	0,43		
S.A.B. + carboidratos	0,17	1,33	4.14×10^{-5}	1,19	1.02×10^{-5}	0,28
S.A.B.+ carboidratos e						
lipídeos	0,05	0,84	0,05	0,67	0,23	0,01

A análise do valor de k_1^{app} para todas as condições em que a fonte protéica foi proveniente da S.A.B. revela que a produção de acetato via degradação de proteínas foi similar no reator alimentado somente com proteínas e com a mistura proteínas e carboidratos. Todavia, o valor de k_1^{app} obtido para a condição de alimentação contendo lipídeos foi aproximadamente 65% menor que os valores obtidos nas outras condições, indicando uma possível diferença na preferências metabólicas do consórcio microbiano presente nessa condição de operação. A produção de acetato via degradação de carboidratos parece ter aumentado após a adição de lipídeos, como indicado pelos valores de k_5^{app} . Ou seja, é possível inferir que a formação de

acetato ocorreu, preferencialmente, via degradação de proteínas, quando o reator foi alimentado com proteínas e carboidratos, ao passo que quando houve a adição de lipídeos, a formação de acetato se deu preferencialmente via degradação dos carboidratos.

O consumo de ácido acético, representado pelo valor de k_2^{app} , se encontra na mesma ordem de magnitude em todas as condições estudadas. Todavia, é maior na condição em que a alimentação foi composta por carboidratos e proteínas. Nessa condição, o consórcio microbiano provavelmente apresentava maior afinidade com o acetato devido à presença dos carboidratos. Tal presença aumenta o teor de carbono presente no afluente do reator, melhorando assim a relação entre as concentrações de carbono e nitrogênio em relação aos efluentes cuja fonte de carbono foi somente a S.A.B. A presença de lipídeos deve ter sido responsável pelo menor valor de k_2^{app} em relação à condição 2, provavelmente devido a presença de compostos inibidores da metanogênese acetoclástica derivados da degradação de tais moléculas, como observado por Vidal *et al* (2000), que estudou o efeito da presença de lipídeos na degradação anaeróbia de co-substratos como proteínas e carboidratos.

Quando se comparam os valores de k_3^{app} e k_6^{app} nas condições onde houve presença de carboidratos, pode-se observar, novamente, uma possível mudança metabólica para a produção de ácido propiônico. Enquanto na condição em que o reator foi alimentado com a mistura de carboidratos e proteínas o propionato foi formado via degradação de carboidratos, sua produção se deu preferencialmente via degradação das proteínas quando houve a adição de lipídeos ao efluente sintético.

Doravante irá se relacionar o valor da constante k_4^{app} com a estabilidade do processo. Tal relação foi proposta porque o processo de acetogênese, via degradação de ácido propiônico (equação 5), é a etapa do processo anaeróbio de degradação da matéria orgânica mais desfavorável termodinamicamente dentre as nove propostas por Harper e Pholand (1986).

Como se pode ver na equação 5, nas condições de pH igual a 7 e pressão igual a 1 atm, caso as espécies químicas localizadas à direita não estejam em concentrações inferiores às indicadas pela equação, a reação ocorre no sentido da formação de ácido propiônico. Segundo Foresti (1994), o processo metanogênico de degradação anaeróbia de matéria orgânica é muito mais dependente de processos reguladores intrínsecos que de controles externos, e o acúmulo do

ácido propiônico no meio, por não ser substrato direto para as arqueas metanogênicas, pode comprometer irreversivelmente o processo. Essa situação ocorre sempre que a pressão parcial de H_2 se eleva, inviabilizando a acetogênese já que a conversão de ácido propiônico a ácido acético só se dá em pressões parciais inferiores a 10^{-4} . A diminuição da produção de ácido acético inviabiliza a manutenção da população de arqueas acetoclásticas, que podem ser removidas do reator, gerando o acúmulo de ácidos. Finalmente, o pH pode ser drasticamente afetado, inviabilizando a metanogênese. Por esse motivo, optou-se pela utilização da constante de primeira ordem do processo acetogênico a partir do ácido propiônico, k_4^{app} , como representante da estabilidade do processo estudado.

Comparando-se os valores dessas constantes nas quatro condições de operação em que a S.A.B. foi fonte de proteínas, pôde-se concluir que o processo de degradação anaeróbia é mais estável na presença de carboidratos e proteínas, devido, provavelmente, à já mencionada melhor relação entre carbono e nitrogênio.

A Tabela 5.2.2. apresenta as velocidades iniciais de degradação de proteínas, podendo-se observar que a presença dos lipídeos reduziu o valor das velocidades iniciais de degradação de proteínas para a metade, aproximadamente. Deve-se colocar, no entanto, que a diminuição da velocidade de degradação das proteínas por si só não compromete o processo. Ao contrário, pode até beneficiá-lo por prevenir o acúmulo de ácidos, como o observado por Vidal *et al* (2000). Os autores afirmam que a presença de lipídeos em águas residuárias de laticínios cuja composição inclui carboidratos e proteínas, causa o decréscimo na velocidade de degradação de matéria orgânica, o que teria evitado o acúmulo de ácidos voláteis em ensaios em batelada realizados em frascos fechados com volume de 500 ml. Em contraste, nas condições operacionais do presente trabalho, a baixa velocidade de degradação de proteínas apareceu concomitantemente com o maior teor residual de ácidos voláteis e menor eficiência do reator. Além disso, nessa condição experimental, foram encontradas as maiores concentrações de ácidos voláteis também ao longo do reator. Essa conjuntura sugere que a presença de lipídeos nas concentrações utilizadas tenha comprometido o processo de degradação anaeróbia de matéria orgânica em um RAHLF operado com 4 horas de tempo de detenção hidráulica. Ou seja, em vez da ocorrência da prevenção de formação dos ácidos em questão, observou-se um ligeiro efeito inibitório na fase de consumo de ácido acético, que pode ser confirmado pela diminuição do valor de k_2^{app} , em relação à condição anterior (sem a adição de lipídeos).

Tabela 5.2.2. Velocidades iniciais de degradação das proteínas nos reatores onde a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas.

Fonte de Carbono	Velocidades iniciais de degradação de proteínas (mg S.A.B. $\cdot$ l ⁻¹ ·h ⁻¹)
S.A.B. (DQO = 400 mg.l ⁻¹)	60,9
S.A.B.+carboidratos	59,5
S.A.B.+carboidratos + lipídeos	35,0
S.A.B. (DQO = 600 mg.l ⁻¹)	91,4

A Figura 5.2.5. apresenta os perfis de produção de nitrogênio na forma amoniacal ao longo do RAHLF em cada uma das condições experimentais em que a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas. Pode-se observar que as tendências dos perfis de produção de nitrogênio na forma amoniacal, acompanham as tendências dos perfis de concentração de proteínas.

Figura 5.2.5. Perfis de produção de nitrogênio na forma amoniacal: RAHLF alimentado com S.A.B. (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de proteínas: S.A.B. (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono (■), S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono (●), S.A.B., carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (▲) e S.A.B. (DQO = 600 mg.l⁻¹) como fonte de carbono (◆).

É possível observar que a concentração de nitrogênio na forma amoniacal no reator alimentado com efluente sintético contendo lipídeos (▲) manteve-se inferior ao longo de todo o

reator, confirmando o possível efeito inibitório de tais moléculas sobre a degradação anaeróbia de proteínas. Os maiores valores de concentração de nitrogênio na forma amoniacal encontrados na condição de operação em que o reator foi alimentado somente com S.A.B. como fonte de carbono ($DQO = 600 \text{ mg.l}^{-1}$) foram atribuídos à maior concentração inicial de proteínas presente nessa condição operacional.

A Figura 5.2.6 apresenta os perfis de concentração de matéria orgânica ao longo do RAHLF nas quatro condições operacionais em que a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas.

As eficiências de degradação de matéria orgânica, calculada a partir dos valores de DQO afluentes e efluentes, foram 91 %, quando o RAHLF foi alimentado somente com S.A.B. ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$) como fonte de carbono; 93 %, quando a alimentação foi composta por S.A.B. carboidratos e lipídeos; 76 %, quando se adicionaram lipídeos; e 83% quando a alimentação novamente foi composta somente por S.A.B como fonte de carbono ($DQO = 600 \text{ mg.l}^{-1}$). Esses resultados indicam que a presença de carboidratos em efluentes com relativa elevada concentração de proteínas não diminui a eficiência de degradação de matéria orgânica. Pode-se notar a diminuição na velocidade inicial de degradação de proteínas. Todavia, a eficiência global de degradação de matéria orgânica foi similar à primeira condição operacional. Tal fato indica que o tempo de detenção hidráulica igual a 4 horas foi suficiente para ocorrência de degradação de matéria orgânica até mesmo quando os carboidratos foram adicionados. Na realidade, a similaridade entre as eficiências de degradação de matéria orgânica indica que, nas condições operacionais testadas, não é necessária a separação prévia de carboidratos e proteínas para se alcançar boas eficiências de degradação, tanto de proteínas, como da matéria orgânica global (representando as proteínas, os carboidratos, ácidos metabólicos formados, etc), como sugeriram Breure *et al.* (1986) e Martins *et al.* (1991). O fato da eficiência de degradação de matéria orgânica na condição 4 ser menor do que na condição 1 pode estar relacionado a dois fatores: o consórcio microbiano pode ter sofrido por, após um substrato diversificado (condições 2 e 3), com melhor relação entre carbono e nitrogênio, ser alimentado novamente com proteínas somente como fonte de carbono; e o efeito inibitório causado pela presença de lipídeos pode não ter sido eliminado do meio.

Figura 5.2.6. Perfis de concentração de matéria orgânica (expressa como DQO) nas quatro condições operacionais onde a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas, A: RAHLF alimentado com S.A.B. (400 mg.l^{-1}) como fonte de carbono, B: RAHLF alimentado com S.A.B. e carboidratos com fontes de carbono, C: RAHLF alimentado com S.A.B., carboidratos e lipídeos como fontes de carbono e D: RAHLF alimentado com S.A.B (600 mg.l^{-1}) como fonte de carbono.

O processo de degradação da S.A.B. ao longo do RAHLF pôde ser visualizado através da eletroforese de proteínas SDS-PAGE (duodecil sulfato de sódio em gel de eletroforese de poliacrilamida), utilizando amostras provenientes da terceira condição operacional. Só realizou-se tal ensaio nessa condição, por ter sido essa a que forneceu piores resultados dentre as testadas, no que diz respeito ao teor residual de proteínas detectado pelo método de Lowry. Além disso, no esgoto sanitário as proteínas são comumente encontradas concomitantemente com outras fontes de carbono com carboidratos e lipídeos. O resultado desse ensaio é apresentado na Figura 5.2.7. O principal alvo do ensaio foi verificar a natureza do teor residual protéico detectado no final do reator, pois suspeitava-se da presença de proteínas produzidas pela biomassa em quantidade comparável àquela mensurada no final do processo. O que se pode observar pelo padrão de bandas, é que não houve a presença de outras proteínas diferentes da adicionada ao

meio afluyente ao reator, pelo menos em quantidades suficientes para serem detectadas pelo método. A única banda visível, diz respeito à S.A.B. em todas as amostras. Os “borrões” localizados a baixo das bandas são representação de produtos de hidrólise protéica, que vão sendo atenuados ao longo do reator. Na saída do reator, após quatro horas de tempo de detenção hidráulica, pode-se observar a presença de proteínas íntegras no efluente. Pode-se inferir dessa forma, que o residual de proteínas nessa e nas outras condições nas quais a S.A.B. foi utilizada como fonte protéica, representa somente essa proteína, ou produtos de sua degradação (peptídeos e aminoácidos) com massa molecular muito baixo para serem detectados nesse tipo de ensaio.

Figura 5.2.7: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo SAB, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.

Legenda:

Mpm: marcador de peso molecular

E: amostra da entrada

1: amostra do ponto de coleta 1

2: amostra do ponto de coleta 2

3: amostra do ponto de coleta 3

5: amostra do ponto de coleta 5

7: amostra do ponto de coleta 7

8: amostra do ponto de coleta 8

9: amostra do ponto de coleta 9

S: amostra da saída

5.2.2. Resultados das Análises Microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. como fonte de proteínas são apresentados nas Tabelas de 5.2.3 a 5.2.6, e ilustrados nas Figuras de 5.2.8 a 5.2.11, que contêm as morfologias consideradas mais frequentes e importantes do ensaio. A simbologia utilizada nessa tabela é indicativa de quantidades relativas de microrganismos ao longo do RAHLF no ensaio.

A presença de asteriscos junto aos indicadores relativos de quantidade de microrganismos ao longo dos ensaios indica a presença da formação de cadeias pelos microrganismos.

As análises de microscopia óptica mostraram várias morfologias presentes no reator, que variaram de acordo com a condição operacional e posição espacial dentro do reator. As morfologias predominantes ao longo de todo o período de operação do reator alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. como fonte de proteínas foram morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp.*, bacilos metanogênicos hidrogenotróficos, filamentos e bacilos não fluorescentes. Cocos fluorescentes e não fluorescentes, morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.*, espiroquetas e bacilos curvos também estiveram presentes.

Na Tabela 5.2.3, pode-se observar a frequência relativa de aparição das diversas morfologias ao longo do reator, após 26 dias de operação com efluente sintético com S.A.B. como única fonte de carbono. De acordo com as morfologias presentes, pode-se realmente inferir que o reator encontrava-se em estado de equilíbrio, pois todas as espécies necessárias à degradação anaeróbia de matéria orgânica encontravam-se presentes e de maneira coerente. Pode-se notar a predominância de bacilos não fluorescentes do início para o final do reator. Essas morfologias provavelmente estão associadas à hidrólise protéica e à fermentação dos aminoácidos provenientes desse processo. Ainda no início do reator, em associação aos bacilos não fluorescentes, pode-se encontrar a predominância de bacilos fluorescentes, provavelmente associados ao processo metanogênico hidrogenotrófico. Esses microrganismos são responsáveis pela remoção de H_2 do meio originado nas reações de acidogênese e acetogênese, provenientes da fermentação dos aminoácidos. A remoção do H_2 presente no meio, por ação das arqueas metanogênicas hidrogenotróficas, é indispensável tanto para o consumo do ácido propiônico (Foresti, 1997), nesse caso formado nos processos de fermentação dos aminoácidos, quanto para a ocorrência de diversas das reações de fermentação dos aminoácidos. Nagasse e Matsuo (1982) e McInerney (1988), entre outros, afirmam que a transferência de H_2 interespecies é

extremamente importante para a ocorrência do processo de fermentação dos aminoácidos cujas reações liberem hidrogênio e são termodinamicamente desfavoráveis em condições padrão. A desaminação e descarboxilação oxidativa com produção de H_2 de alguns aminoácidos reduzidos, como a alanina, é desfavorável em condições padrão. Isso indica que a produção de H_2 a partir desses compostos só irá ocorrer se a pressão parcial de H_2 no meio for mantida baixa pelas espécies utilizadoras de hidrogênio. A produção de hidrogênio a partir de outros aminoácidos mais oxidados, como o glutamato, no entanto, é favorável em condições padrão. Portanto, pode-se dizer que essas reações não dependem da retirada de H_2 do meio.

A partir do terceiro ponto de amostragem, pode-se notar o aumento progressivo de morfologias associadas a *Methanosaeta* sp., que se apresentam em predominância até o final do reator. Esse padrão de aparecimento de microrganismos pode ser associado ao perfil de produção e consumo de ácido acético presente na Figura 5.2.1.. Como se pode observar nessa figura, o pico de acúmulo de ácido acético ($50,6 \text{ mg.l}^{-1}$) realmente se encontra no terceiro ponto de amostragem do reator, sendo seguido por uma constante queda nos valores de concentração acumulada. Pode-se inferir, dessa forma que, sendo substrato preferencial desse tipo de microrganismo, o ácido acético foi gradativamente formado pelos microrganismos acidogênicos (bacilos não fluorescentes predominantemente) propiciando o aparecimento predominante de morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp, e posteriormente consumido por esses microrganismos, garantindo seu predomínio até o final do reator.

Após a adição de carboidratos ao efluente sintético, as morfologias semelhantes a *Methanosaeta* sp. mostraram-se mais presentes desde o início do reator quando compara-se a frequência de aparecimento com a condição anterior. A ocorrência dessa re-alocação está ligada, também, ao perfil de concentração de ácido acético presente na Figura 5.2.2.. Nessa figura, pode-se observar que os valores no terceiro ponto de amostragem do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo somente S.A.B. como fonte de carbono, foram atingidos nessa condição já no segundo ponto de amostragem. Essa produção de ácido acético ligeiramente mais rápida está possivelmente ligada à degradação dos carboidratos, que segundo Breure *et al.*(1986) e Martins *et al.* (1991), se dá mais rapidamente que a degradação das proteínas, aumentando o valor da concentração acumulada. É importante citar que, segundo a Tabela 5.2.1, os valores de k_1^{app} , constante de primeira ordem de produção de ácido acético a partir da degradação das proteínas, são semelhantes (levemente superior para a condição onde há a presença de carboidratos) e o valor de k_5^{app} , constante de primeira ordem de produção de ácido acético a partir da degradação de carboidratos é desprezível, o que resulta em velocidades de produção de

ácido acético semelhantes para as duas condições. Todavia, o que se mostrou mais importante após a adição dos carboidratos foram duas ocorrências: o expressivo aumento na frequência de aparição dos microrganismos filamentosos, que se mostraram predominantes quase que ao longo de todo o reator, e o aumento na frequência de aparecimento de bacilos curvos desde o início do reator. A presença dos bacilos curvos, normalmente associados ao processo de redução de sulfato, provavelmente está ligada ao processo de fermentação do ácido acético, devido aos baixos níveis de sulfato presentes no efluente sintético. É possível que tenha havido algum processo de competição pelo acetato entre os bacilos curvos e as morfologias associadas à *Methanosaeta sp.* presentes no meio. Todavia, ambas as morfologias parecem ter convivido em harmonia, já que essa condição operacional propiciou os melhores resultados em termos de remoção de matéria orgânica e os menores teores residuais de ácidos voláteis dentre as condições nas quais a S.A.B. foi fonte de proteínas. Na verdade, essa melhora na eficiência global pode estar relacionada ao aumento na frequência dos bacilos curvos, já que Polprasert & Haans (1995) afirmam que a contribuição das bactérias redutoras de sulfato na remoção de matéria orgânica aumenta quando são aumentadas as relações glicose / acetato, como foi o caso dessa condição operacional em relação à anterior.

Com a adição de lipídeos, a predominância dos microrganismos filamentosos foi mais evidente ainda do que na condição operacional onde o efluente sintético era composto por proteínas e carboidratos como fonte de carbono. O que também se intensificou foi a predominância de bacilos curvos associados à *Dessulfovibrio sp.*, novamente associados ao processo fermentativo do acetato e também à fermentação de lipídios, que, segundo Voordouw (1995), ocorre via ação de bactérias redutoras do íon sulfato na ausência desse íon. Outro fato importante diz respeito à forte presença de cocos do meio para o final do reator. Segundo McInerney (1988), a maioria dos microrganismos proteolíticos encontrados em lodos de biodigestores é formada por clostrídios. Todavia, *Peptococcus sp.* e *Staphylococcus sp.* também estão presentes em grande número desempenhando a função de degradação das proteínas. Como a concentração residual de proteínas foi elevada no final do reator após a adição dos lipídeos ao efluente sintético, é possível inferir que a presença desses microrganismos esteja ligada ao processo de fermentação de aminoácidos com formação de ácidos e posteriormente ácido acético como substrato para as arqueas metanogênicas, ainda firmemente presentes nessa fração do reator. Em relação aos cocos, nota-se também a formação de cadeias envolvendo de duas a seis células. Segundo Madigan *et al.* (1997), o comportamento da formação de cadeias pode estar ligado à presença de condições adversas no meio, possivelmente causadas pela presença dos

lipídeos.

Na Tabela 5.2.6, é possível notar que, após a retirada dos lipídeos e carboidratos, as morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.* diminuíram sua frequência de aparição. Em contrapartida, o predomínio de filamentos tornou-se ainda mais evidente. Em relação aos cocos e bacilos curvos, pode-se dizer que não houve muita variação na frequência de aparição desses microrganismos em relação à condição experimental anterior. O teor residual de proteínas no final do reator nessa condição operacional também foi semelhante à condição operacional anterior.

Tabela 5.2.3: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. (DQO= 400 mg.l⁻¹) como única fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha sp.</i>	+	++	+++	+++	+	+++	+++	++++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>				+	+			+	+
B. Fluorescente 1	++++	++++	+++	+	++	+	++	++	++
B. Fluorescente 2	++	++	++	+++	+	+++		+	+
C. Fluorescente	+	++			+				
F. Fluorescente				+					
B. curvo Fl.									+
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1						+			
Bacilo curvo 2	++	++	+	+		+++		++	+
Filamento 1	++	++	++	++++	++	++	++	+	+
Filamento 2	+++	+++	+	++	++	+			
Filamento 3	++	+	++		+	+++	++	+++	+
Bacilo 1		++	++			+	+		
Bacilo 2	++++	++++	+++	+++		++++	+	++	+++
Bacilo 3	+					++++	+		
Bacilo 4									
Bacilo 5				++			+		
Bacilo 6		+							
Espiroqueta 1	+				+				
Vibrios unidos									
Cocobacilo	++		++	+	+	++	+	+	+
Cocos 1	+					++++	+	+	+
Cocos 2	+	++	++	+		++	+	++	+++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.2.8: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB (DQO = 400 mg.l⁻¹) como única fonte de carbono. a: → morfologia semelhante à *Methanosarcina* sp. , → filamentosa 3; b: → fluorescência de a.; c: → bacilo 1, → bacilo 2 → filamentosa 2; d: → bacilo fluorescente 1; e: → coco 2, → bacilo 5; f: → bacilo fluorescente 2.

Tabela 5.2.4: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha sp</i>	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>		+						+	
B. Fluorescente 1	++	+++	+	+	++	+++	+++	+	++
B. Fluorescente 2	++	++	+	+++	+	+++	++	+	
C. Fluorescente	+								
F. Fluorescente	+								
B. curvo Fl.									
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	++	+			+	+			
Bacilo curvo 2	+++	+++	+	++	++	+++	++	++	+
Filamento 1	++	++	++	+	++	+++		+	
Filamento 2	++++	+++	+++	++++	++++	++++	++++		
Filamento 3	++++	+++	+	+++	++	++++	++++	++++	+
Bacilo 1	+	+	+	+	+	+			
Bacilo 2	++	+		++	++	+	++	++	++++
Bacilo 3					++	+	+		+
Bacilo 4		+			++	++*			+
Bacilo 5					++	++	+	+	++
Bacilo 6				+					
Espiroqueta 1	+	+		+	+		+	+	
Vírios unidos	+						+		
Cocobacilo	++	+		+	+	+			
Cocos 1	+		+		++	+	+	+	+
Cocos 2	+	+	++	+++	+	+	+++	+++	

+: morfologias raramente presentes,

++: morfologias presentes,

+++ : morfologias presentes frequentemente e

++++: morfologias predominantes.

Figura 5.2.9: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB e carboidratos como fontes de carbono. a: → bacilo 1; b: → cocobacilo; c: →coco 1; d: →bacilo fluorescente 2, e: →filamentosa 1; f: →bacilo curvo 1.

Tabela 5.2.5: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. carboidratos e lipídeos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência.

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha sp</i>	++	+++	+++	++	+++	+	++	+++	
<i>Methanosarcina sp.</i>	+			+					+
B. Fluorescente 1	++	+		+++	++	+++		++	++
B. Fluorescente 2	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
C. Fluorescente				+++					
F. Fluorescente	+	+	+			+++	++		+
B. curvo Fl.									
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1		+	+		+	+		++	
Bacilo curvo 2	++	++	++	+	++	++	++	++++	++
Filamento 1	++	+	++	+	+	+++	++	+	++
Filamento 2	+	++	+++	+	++	++++	++++	++	++
Filamento 3	++	++	++	+	++	+++	++	++	+
Bacilo 1	++	++	++		+	+	+	+	+
Bacilo 2	+++	++	++	+++	+	++	++++	++++	+++
Bacilo 3	+++	++	++			++	+	+++	+
Bacilo 4			+		+				
Bacilo 5			++		++		++	++	++
Bacilo 6		+							
Espiroqueta 1	+		+		+		+		
Vibrios unidos					+	+			
Cocobacilo	+		++	++	+	++	+	+	
Cocos 1		+			+	+	+		+
Cocos 2	+	++	+++		+++*	++++*	+++*	+++*	+++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.2.10: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com SAB, carboidratos e lipídeos como fontes de carbono. a: contraste de fase da foto b; b: → filamento fluorescente; c: → cocos 2 → espiroqueta; e: → cocos fluorescente; f: morfologia semelhante à *Methanosaeta* sp.

Tabela 5.2.6.: morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. (DQO= 600 mg.*l*⁻¹) como única fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha sp</i>	+++	++	+	+	+++	+++	++	+	++++
<i>Methanosarcina sp.</i>									
B. Fluorescente 1	+	++	++	+++	++	+++	+	+++	++
B. Fluorescente 2	++	+	+++	++	+++	+	+++	+++	++
C. Fluorescente						+			
F. Fluorescente	++								
B. curvo Fl.									
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1		+	+	++	+	+		+	
Bacilo curvo 2	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+
Filamento 1	+++	+	++	++++		+++	+++	+++	+
Filamento 2	++++	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	
Filamento 3	++++	++	++		+++	++	+++	+	
Bacilo 1	++	++	+	+		+	+	++	
Bacilo 2	+++	++++	+++			++	+	+	
Bacilo 3		+						+	
Bacilo 4			++	++	++	+	++	+	
Bacilo 5			++	++	++	+	++	+	
Bacilo 6									
Espiroqueta 1	++	+	++			+	+		+
Víbrions unidos									
Cocobacilo	++	+	++	+		+	++	++	+
Cocos 1	+	+	+	+	+	+	+++	+	+
Cocos 2	++	++*	++	++		++	++	+++	+++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++; morfologias presentes,
 +++; morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.2.11: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com somente com S.A.B. ($DQO = 600 \text{ mg.l}^{-1}$), carboidratos e lipídeos como fontes de carbono. a: → espiroqueta; b: →coco 1; c: fluorescência da foto d; d: → morfologias que fluorescem; e: → bacilo 3; f → cocos fluorescentes.

As matrizes provenientes do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. como fonte de proteínas foram também preparadas de acordo com metodologia descrita por Nation (1983) modificada por Araújo (1995). Com isso, as matrizes foram analisadas íntegras em microscópio eletrônico de varredura. Os resultados de tal análise encontram-se ilustrados na Figura 5.2.12.

As análises realizadas no microscópio eletrônico de varredura revelaram que os padrões de imobilização encontrados foram semelhantes àqueles observados por Varesche *et al.* (1997) em matrizes de poliuretano retiradas de um Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo tratando efluente sintético à base de glicose, e por Tommaso *et al.* (2002) em matrizes de poliuretano retiradas de um reator diferencial tratando efluente sintético à base de gelatina.

Figura. 5.2.12: Morfologias adquiridas em microscópio eletrônico de varredura presentes em matrizes de poliuretano provenientes de RAHLF alimentado com S.A.B. como fonte de proteínas. Aumento de 5000 vezes em todas as micrografias.

5.3. Resultados dos Ensaio Utilizando Peptona.

5.3.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.

Para a realização desse experimento, operou-se um RAHLF em escala de bancada em quatro condições diversas. Na primeira condição, o reator operou cerca de 30 dias alimentado com efluente sintético à base de peptona com DQO média de 400 mg.l^{-1} , com produção de alcalinidade total em torno de $144,82 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1}$. Na segunda condição, com adição de carboidratos ao efluente sintético anterior, o reator foi operado cerca de 10 dias com produção de alcalinidade total por volta de $136,94 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1}$. Na terceira condição, com adição de lipídeos ao efluente sintético anterior, o reator foi operado por 10 dias com produção de alcalinidade total de $116,25 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1}$. Finalmente na quarta condição, com efluente sintético a base de peptona com DQO média de 600 mg.l^{-1} , o reator foi operado cerca de 10 dias com produção de alcalinidade total por volta de $193,10 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1}$. A produção de alcalinidade total durante as condições operacionais foi praticamente constante, e com isso, os processos foram considerados estáveis e prontos para a realização do experimento de determinação de parâmetros cinéticos aparentes e inferência de rotas metabólicas da degradação anaeróbia de peptona.

Os resultados da aplicação do modelo cinético proposto para o RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona ($\text{DQO} \sim 400 \text{ mg.l}^{-1}$), peptona e carboidratos ($\text{DQO} \sim 550 \text{ mg.l}^{-1}$), peptona, carboidratos e lipídeos ($\text{DQO} \sim 600 \text{ mg.l}^{-1}$) e novamente peptona ($\text{DQO} = 600 \text{ mg.l}^{-1}$) como fontes de carbono estão descritos nas Figuras 5.3.1 a 5.3.4. As constantes cinéticas fornecidas pelo modelo se encontram na Tabela 5.3.1.

Figura 5.3.1.: Perfis das concentrações de derivados protéicos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l⁻¹): derivados protéicos (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,96233.

Figura 5.3.2.: Perfis das concentrações de derivados protéicos, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona e carboidratos como fontes de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l⁻¹): derivados protéicos (■); carboidratos (●); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); e valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,98124.

Figura 5.3.3.: Perfis das concentrações de derivados proteicos, carboidratos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona, carboidratos e lipídios como fontes de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l^{-1}): derivados proteicos (■); carboidratos (●); ácido acético (★) ácido propiônico (◆); e valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,96135$.

Figura 5.3.4.: Perfis das concentrações de derivados proteicos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona ($\text{DQO} = 600 \text{ mg.l}^{-1}$) como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l^{-1}): derivados proteicos (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆).

O experimento foi realizado com concentração de bicarbonato de sódio afluyente de 1 g.l^{-1} por motivos previamente explicados no item de Materiais e Métodos. Não foi possível

realizar ajuste adequado do modelo proposto aos dados obtidos na condição operacional onde a peptona foi fonte de carbono única com DQO semelhante a 600 mg.l^{-1} (Figura 5.3.4). Pelos dados de perfil apresentados, pode-se inferir que houve a perda gradativa da biomassa metanogênica, evento esse discutido em detalhes no item 5.2.2. O fato ocorrido pode estar relacionado com algum tipo de inibição sofrida pelo processo, que resultou em baixíssimas velocidades de remoção de matéria orgânica, com elevadas concentrações no efluente do reator (Figura 5.3.7). Com isso, é possível que a etapa do processo mais afetada tenha sido a de consumo de ácido acético, resultando em teores acumulados mais elevados quando comparados com os outros experimentos realizados no presente trabalho. A remoção de derivados protéicos foi bem maior que a remoção global de matéria orgânica, o que novamente indica que a etapa de consumo de ácidos orgânicos foi afetada. Tais fatos reforçam a hipótese de ocorrência de processo inibitório. Tal suposição pode ser confirmada pelos valores das constantes cinéticas apresentados na Tabela 5.3.1. De uma forma geral, pode-se observar maiores valores para as constantes de produção de ácidos acético (k^{app}_1 e k^{app}_5) e propiônico (k^{app}_3 e k^{app}_6) e menores valores para as constantes de consumo de tais ácidos (k^{app}_2 e k^{app}_4), quando se comparam tais valores com os valores das mesmas constantes encontradas quando a S.A.B. foi utilizada como fonte de proteínas. Em particular, os valores da constante k^{app}_4 chamam muita atenção para sustentar a hipótese de provável inibição, pois se apresentam consideravelmente menores, sinalizando para uma possível elevação na pressão parcial de H_2 no meio líquido, favorecendo o acúmulo de ácido propiônico no meio. Por exemplo, quando o reator foi alimentado com peptona e carboidratos, o valor obtido para esse parâmetro é de aproximadamente 12% do obtido para esse parâmetro quando o reator foi alimentado com S.A.B. e carboidratos.

Apesar da possível elevada pressão parcial no meio líquido, a peptona foi degradada. Todavia, Stams (1994) alerta que a transferência de interespecies de H_2 , mantendo baixa a pressão parcial de hidrogênio no meio líquido, é de extrema importância para a ocorrência do processo de fermentação de aminoácidos em meio anaeróbico. McInnerney (1988) salienta que a manutenção da pressão parcial de H_2 baixa no meio só é importante nos processos de fermentação de aminoácidos cuja degradação produza H_2 , e tal reação seja desfavorável termodinamicamente. Nagasse & Matsuo (1982) concluem em seu trabalho que, com a inibição da metanogênese, e na presença de aminoácidos participantes de reação de Stickland, o processo de fermentação de aminoácidos que sofrem esse tipo de reação de oxi-redução continua ocorrendo, algumas vezes com mudanças metabólicas. Portanto, a elevação da pressão parcial de H_2 só é desfavorável aos processos de fermentação de aminoácidos que produzam H_2 de maneira

termodinamicamente desfavorável e nos quais as reações de Stickland não ocorram; ou quando passíveis de ocorrer ou ocorrendo efetivamente, o meio não disponha de aminoácidos para servirem como aceptor ou fornecedor de elétrons, dependendo do caso.

A Figura 5.3.5 mostra a composição da peptona. Pode-se notar a presença de glutamato, valina, leucina e alanina, aminoácidos estes cujos processos de desaminação dão origem a H_2 . Mas a reação é termodinamicamente desfavorável à formação de H_2 (McInnerney, 1988). Todavia, valina, leucina e alanina também participam de reações de oxi-redução de Stickland, sendo que a composição da peptona contempla oxidantes e redutores participantes desse tipo de reação em igual proporção, favorecendo a ocorrência de reação de Stickland após o processo de hidrólise. O glutamato possui três passos metabólicos de degradação, todos com produção de H_2 , sendo um deles termodinamicamente desfavorável sob condições padrão, descritos nas equações 5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3 (Stams & Hansen, 1984). Caso a pressão parcial de H_2 tenha sido elevada, é de se supor que tenha ocorrido a fermentação do glutamato via um dos passos termodinamicamente favoráveis, produzindo acetato, e propionato, e não α -cetoglutarato. Tais fatos explicariam porque, apesar da possível elevação da pressão parcial de hidrogênio, a concentração de peptona diminuiu cerca de 90%. Os perfis de nitrogênio amoniacal ilustrados na Figura 5.3.6. encontram-se de acordo com essa afirmação.

Figura 5.3.5: Composição da peptona extraída de carne bovina. Fonte: www.organotechnie.com

Outro fator importante a ser ressaltado é que, houve a diminuição do valor de k^{app}_4 , quando se introduziu carboidrato na alimentação do RAHLF. Tal fato pode indicar que a instabilidade do reator pode ter aumentado devido à adição de um co-substrato facilmente degradável.

Tabela 5.3.1 Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se peptona como fonte de carbono, única ou combinada nos efluentes sintéticos fornecidos ao RAHLF (concentração de bicarbonato de sódio afluente igual a 1000 mg.l^{-1}).

Fonte de carbono	$k^{app}_1 (\text{h}^{-1})$	$k^{app}_2 (\text{h}^{-1})$	$k^{app}_3 (\text{h}^{-1})$	$k^{app}_4 (\text{h}^{-1})$	$k^{app}_5 (\text{h}^{-1})$	$k^{app}_6 (\text{h}^{-1})$
Peptona (DQO = 400 mg.l^{-1}).	0,39	0,38	0,24	0,25		
Peptona + carboidratos	0,24	0,38	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,13	0,35	0,22
Peptona + carboidratos e lipídeos	0,042	0,05	0,21	0,14	1,08	0,51
Peptona (DQO = 600 mg.l^{-1})	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu

Figura 5.3.6. Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniaca no RAHLF alimentado com efluentes sintéticos à base de peptona: Peptona (DQO = 400 mg.l⁻¹) - (■); peptona e carboidratos (●); peptona, carboidratos e lipídeos - (▲) e peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) - (◆).

Figura 5.3.7.: Perfis do teor de matéria orgânica (expressa com DQO) nas quatro condições operacionais onde a peptona foi utilizada como fonte de carbono, única ou combinada. A: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona (400 mg.l⁻¹); B: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de e carboidratos; C: RALHF alimentado com efluente sintético à base de, carboidratos e lipídeos; e D: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona (600 mg.l⁻¹).

Todos os fatos apresentados indicam que o reator foi submetido a um processo de inibição da metanogênese. Essa inibição não ocorreu devido ao pH, pois os perfis dessa medida (Figura 5.3.8) não refletiram nenhuma condição de inibição, ou seja, o pH não decresceu com o aumento da concentração de ácidos em nenhuma das condições operacionais, o que demonstra a boa capacidade de tamponamento do meio, que realmente possuía concentração elevada de bicarbonato de sódio. Essa concentração não afetou negativamente os processos de degradação anaeróbia da caseína e da S.A.B., porém, pode ter contribuído para o não consumo de ácidos verificado principalmente nos reatores alimentados com peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) e peptona, carboidratos e lipídeos. Na verdade, segundo McCarty & McKinney (1961), muitos dos problemas encontrados em reatores anaeróbios, comumente associados ao elevado teor de ácidos, deveriam ser relacionados à toxicidade causada pela presença de sais em excesso sobre

os microrganismos consumidores dos citados ácidos. A toxicidade causada pelos sais está muito mais relacionada à presença do cátion em solução do que do ânion. Dados levantados pelos autores permitiram concluir que sais de sódio em excesso podem ser extremamente tóxicos à metanogênese, sendo que tal efeito pode ser minimizado ou mesmo eliminado pela presença de cálcio ou magnésio em solução. A concentração de Na^+ utilizada nesse trabalho pode não ter sido único fator responsável pelo processo inibitório verificado no processo de degradação do efluente sintético a base de peptona, todavia, pode ter sido coadjuvante a outros fatores presentes no sistema e ter colaborado para acentuar o problema de acúmulo de ácidos.

Outra possibilidade levantada para a instabilidade do reator foi a ocorrência de um processo homoacetogênico via respiração do bicarbonato. Esse processo pode ter ocorrido devido às elevadas concentrações de bicarbonato no meio e ter colaborado para os elevados teores de ácidos encontrados ao longo do RAHLF, principalmente quando a peptona foi administrada juntamente com carboidratos, carboidratos e lipídeos e sozinha com $\text{DQO} = 600 \text{ mg.l}^{-1}$. Esse processo é relatado em detalhes por Dolfing (1998), e pode ser descrito pela equação 5.2.4:

Segundo Dolfing (1998), em 1942, Fontaine descobriu que *Clostridium thermoaceticum* fermenta 1 mol glicose com a formação de 3 mols de acetato, sendo um deles proveniente da redução do CO_2 . Esse resultado fomentou a hipótese de um tipo autotrófico de acetogênese ocorrer concomitantemente à fermentação acetogênica da glicose. Muito se pesquisou desde então sobre a homoacetogênese via respiração do CO_2 , tendo-se descoberto algumas espécies capazes dessa conversão, dentre elas *Clostridium aceticum*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetogenium kivui*, *Acetobacterium woodii* e *Acetobacterium wieringae*. Essa última espécie foi isolada a partir de lodo anaeróbio proveniente de um digestor anaeróbio.

O ganho energético em condições padrão para a equação dois é semelhante ao ganho energético obtido pelas arqueas metanogênicas hidrogenotróficas ($\Delta G^\circ = -135,6 \text{ KJ / reação}$), sugerindo uma possível competição desses microrganismos com os homoacetogênicos autotróficos. É possível que a homoacetogênese autotrófica tenha ocorrido em todos os experimentos realizados nesse trabalho de pesquisa nos quais o bicarbonato se encontrava em excesso no meio (1 g.l^{-1}). Todavia, no caso da peptona, a ocorrência de tal processo pode ter desbalanceado todo o sistema, pois a velocidade de degradação desse composto é muito superior

às outras velocidades de degradação observadas nesse trabalho, devido à peptona ser um hidrolisado protéico.

Figura 5.3.8 – Perfis de pH nos experimentos em que a peptona foi utilizada como fonte de carbono única ou combinada e a concentração de bicarbonato de sódio afluente foi de 1000 mg.l⁻¹, (♦) RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona (400 mg.l⁻¹); (■), RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona e carboidratos; (▲) RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona, carboidratos e lipídeos; e (×) RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona (600 mg.l⁻¹).

Após a suposição de ocorrência de efeito inibitório causado provavelmente pela elevada concentração de bicarbonato de sódio, optou-se pela diminuição da concentração de tal sal no efluente ao reator, utilizando-se as concentrações usualmente empregadas na preparação de efluente sintético simulando esgoto sanitário (Torres, 1992).

As produções de alcalinidade total ao longo das condições operacionais foram, como de costume, praticamente constantes, iguais a 180,05 mg CaCO₃.l⁻¹, 141,36 mg CaCO₃.l⁻¹, 142,85 mg CaCO₃.l⁻¹, 251,47 mg CaCO₃.l⁻¹, na primeira, segunda, terceira e quarta condição operacional respectivamente.

Os resultados da aplicação do modelo cinético proposto para o RAHLF alimentado com efluentes sintéticos a base de peptona com concentração afluente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l⁻¹, estão descritos nas Figuras 5.3.9 a 5.3.12. As constantes cinéticas fornecidas pelo modelo se encontram na Tabela 5.3.2.

Figura 5.3.9: Perfis das concentrações de derivados proteicos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l⁻¹): derivados proteicos (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,98374.

Figura 5.3.10: Perfis das concentrações de derivados proteicos, carboidratos, e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l⁻¹): derivados proteicos (■); carboidratos (●); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); e valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,98124.

Figura 5.3.11: Perfis das concentrações de derivados protéicos, carboidratos e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l^{-1}): derivados protéicos (■); carboidratos (●); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); e valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,95985$.

Figura 5.3.12: Perfis das concentrações de derivados protéicos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com peptona ($\text{DQO} = 600 \text{ mg.l}^{-1}$) como fonte de carbono (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l^{-1}): derivados protéicos (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); e valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,98538$.

Tabela 5.3.2 Constantes cinéticas aparentes obtidas nos experimentos realizados utilizando-se concentração de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l⁻¹ e peptona como fonte de carbono, única ou combinada, nos efluentes sintéticos fornecidos ao RAHLF.

Fonte de carbono	k_1^{app} (h ⁻¹)	k_2^{app} (h ⁻¹)	k_3^{app} (h ⁻¹)	k_4^{app} (h ⁻¹)	k_5^{app} (h ⁻¹)	k_6^{app} (h ⁻¹)
Peptona (DQO = 400 e 600 mg.l ⁻¹)	0,19	1,08	0,12	0,70		
Peptona + carboidratos	0,14	0,60	0,16	0,32	0,87	-
Peptona + carboidratos e lipídeos	0,07	0,28	0,17	0,34	0,88	-

Nesse caso, o modelo apresentou bom ajuste aos dados experimentais, o que é comprovado pelos coeficientes de correlação obtidos em todas as quatro condições de operação. Talvez os fatos mais importantes a serem ressaltados são os aumentos das constantes de consumo de ácidos k_2^{app} e k_4^{app} em relação aos experimentos realizados com concentração de bicarbonato de sódio mais elevada. O aumento de k_2^{app} indica a diminuição ou, possivelmente, a eliminação do efeito inibitório na fase de consumo de ácido acético, enquanto que o aumento de k_4^{app} indica que o reator tornou-se mais estável. Portanto, é provável que o excesso de bicarbonato de sódio tenha prejudicado o processo. O efeito prejudicial deve ter sido decorrente tanto da inibição causada por sódio, quanto pelo favorecimento de rota alternativa de homoacetogênese heterotrófica. Todavia, cabe ressaltar o que realmente impulsionou os problemas operacionais encontrados: a elevada velocidade inicial de degradação de peptona. A Tabela 5.3.3 ilustra esse efeito nos dois experimentos realizados. Nota-se que houve diminuição das velocidades quando reduziu-se a quantidade de bicarbonato no afluente ao reator, com exceção da condição onde havia presença de derivados protéicos e carboidratos. Os valores, todavia, se encontram muito superiores aos já observados em reatores alimentados com efluentes à base de S.A.B.. Tal fato ocorreu muito provavelmente devido à peptona ser um produto de hidrólise controlada de proteínas presentes na carne, e não uma proteína íntegra como a S.A.B..

Tabela 5.3.3 Velocidades iniciais de degradação de derivados protéicos nos reatores onde a peptona foi utilizada como fonte de carbono, única ou combinada, com concentração de bicarbonato de sódio afluente de 400 mg.l⁻¹.

Fonte de Carbon	Velocidades iniciais de degradação de derivados protéicos (mg S.A.B.l ⁻¹ .h ⁻¹)
Peptona (DQO ~ 400 mg.l ⁻¹ e concentração afluente de bicarbonato de sódio = 1 g.l ⁻¹)	215,5
Peptona + Carboidratos (concentração afluente de bicarbonato de sódio = 1 g.l ⁻¹)	82,6
Peptona + Carboidratos + Lipídeos (concentração afluente de bicarbonato de sódio = 1 g.l ⁻¹)	86,2
Peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹ e concentração afluente de bicarbonato de sódio = 400 mg.l ⁻¹)	99,2
Peptona + Carboidratos (concentração afluente de bicarbonato de sódio = 400 mg.l ⁻¹)	102,6
Peptona + Carboidratos + Lipídeos (concentração afluente de bicarbonato de sódio = 400 mg.l ⁻¹)	82,8
Peptona (DQO ~ 600 mg.l ⁻¹ e concentração afluente de bicarbonato de sódio = 400 mg.l ⁻¹)	150,0

Pode-se notar que k_1^{app} reduziu-se em 22,5 % após a adição de carboidratos e posteriormente, mais 50% após a adição de lipídeos, indicando que a formação de ácido acético via degradação de derivados protéicos diminuiu quando se adicionaram outras fontes de carbono ao efluente sintético fornecido ao reator. Todavia, a velocidade de degradação de derivados protéicos manteve-se praticamente constante após a adição de carboidratos, só diminuindo após a adição dos lipídeos. O valor da constante k_2^{app} foi reduzido em 44% após a adição de carboidratos e mais 53% após a adição de lipídeos, indicando que o processo de consumo de ácido acético também diminuiu à medida que se adicionaram outras fontes de carbono. Em relação à constante k_4^{app} , relacionada à estabilidade do processo, pode-se ver que seu valor decresceu em 55% após a adição de carboidratos e aumentou 7,5% após a adição de lipídeos. A partir desses resultados, é possível afirmar que a estabilidade do processo tornou-se menor com a adição de carboidratos; todavia, manteve-se constante ou tornou-se ligeiramente maior após a adição de lipídeos. Possivelmente, a presença dos lipídeos retardou o processo de degradação de derivados protéicos, tornando menor a velocidade de formação dos ácidos, resultando em maior

estabilidade do processo no que diz respeito à formação de ácido acético via degradação do ácido propiônico.

Observando-se os valores de k_3^{app} , pode-se notar que a formação de propionato a partir da degradação de derivados protéicos foi progressivamente aumentando com a adição das outras fontes de carbono. Como os valores de k_6^{app} foram considerados desprezíveis, pode-se inferir que não houve produção de tal ácido via degradação de carboidratos, ou seja, o propionato foi preferencialmente formado via degradação de proteínas quando outras fontes de carbono estavam presentes. Nas Figuras 5.3.10 e 5.3.11, é possível ver que os carboidratos foram consumidos integralmente antes dos derivados protéicos e de maneira mais rápida, como indicam as inclinações das curvas de decaimento de carboidratos e derivados protéicos. Tal fato já havia sido relatado por Breure *et al.* (1996) e Martins *et al.* (1991). Como o processo de degradação de carboidratos foi o principal responsável pela formação do ácido acético, a concentração de tal composto aumentou no meio líquido, favorecendo a formação de propionato no processo subsequente, que foi a degradação de derivados protéicos. É possível que tal acontecimento tenha sido ocasionado pela elevação da pressão parcial de H_2 que, todavia, não subiu o suficiente para promover a inibição do processo acetogênico via degradação de propionato. Entretanto, quando se comparam os valores de k_1^{app} , k_4^{app} e k_5^{app} , nota-se que os principais precursores do ácido acético foram os carboidratos, quando estavam presentes, e não o propionato, como observado nos processos de degradação da S.A.B. com outras fontes de carbono presentes.

Com a diminuição da concentração afluyente de bicarbonato de sódio, as remoções de matéria orgânica foram superiores às encontradas no experimento anterior (Figura 5.3.15), o que, mais uma vez, indica a presença de algum tipo de inibição nos reatores com concentração de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l^{-1} . Contudo, pode-se notar que a porcentagem de degradação das derivados protéicos foi superior à porcentagem de degradação de matéria orgânica. Sabendo-se que os carboidratos foram totalmente degradados e que os lipídeos encontraram-se abaixo dos limites de detecção já no segundo ponto de amostragem, pode-se afirmar que os teores residuais de matéria orgânica, nesse ensaio, foram devidos à presença de ácidos voláteis. Resultados semelhantes foram encontrados por Fang & Wai - Chung Chung (1999), no estudo da degradação de peptona em reatores do tipo UASB. Gadelha *et al.* (2000), no entanto, encontraram grande parte do residual de matéria orgânica composto por proteínas em efluente desse mesmo tipo de reator utilizado no tratamento de esgoto sanitário. No presente trabalho de pesquisa, o reator foi previamente operado para a degradação de S.A.B., sendo que parte do

residual de matéria orgânica consistia em proteínas íntegras. Com isso, pode-se afirmar que, por ser um hidrolisado protéico, a peptona é rapidamente fermentada e convertida a ácidos voláteis. Na verdade, a velocidade de degradação desse hidrolisado constitui-se, provavelmente, no maior problema ao processo metanogênico. Por outro lado, o processo hidrolítico de proteínas íntegras como a S.A.B. e como as presentes no esgoto sanitário, pode se constituir na etapa limitante do processo, como indicado por McInerney (1988), Sayed (1987), entre outros. De fato, a presença de proteínas é sempre relatada como percentual importante da matéria orgânica residual efluente aos reatores anaeróbios e, provavelmente, esse residual protéico diga respeito a proteínas íntegras, não hidrolisadas por microrganismos. Possivelmente, isso se deve a fatores relacionados a ganhos energéticos, comparados ao gasto necessário para a produção de enzimas para hidrólise de determinada concentração mínima de proteínas.

O processo de degradação da peptona não pôde ser visualizado através da eletroforese de proteínas SDS – PAGE justamente devido à massa molecular desse composto ser inferior ao detectado pelo método. Portanto, não se pode inferir nada acerca do peso molecular dos pequenos residuais de derivados protéicos encontrados nos processos de degradação da peptona com ou sem co-efluentes presentes.

Os valores de pH mantiveram-se, como sempre; em faixa adequada ao consórcio metanogênico. Os perfis de produção de nitrogênio amoniacal (Figura 5.3.13) acompanharam a tendência dos perfis de decréscimo de derivados protéicos.

Figura 5.3.13.: Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal no RAHLF alimentado com efluentes sintéticos à base de peptona e concentração de alcalinidade afluente igual a 400 mg.l⁻¹: RAHLF alimentado com Peptona (DQO = 400 mg.l⁻¹): Peptona (DQO = 400 mg.l⁻¹) - (■); peptona e carboidratos (●); peptona, carboidratos e lipídeos (▲); e peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) - (◆).

Figura 5.3.14.: Perfis de concentração de matéria orgânica (expressa com DQO) nas quatro condições operacionais onde a peptona foi utilizada como fonte de carbono única ou combinada (concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 400 mg.l^{-1}) A: RAHLF alimentado co efluente sintético à base de peptona (400 mg.l^{-1}); B: RAHLF alimentado co efluente sintético à base peptona e carboidratos; C: RAHLF alimentado co efluente sintético à base peptona, carboidratos e lipídeos; e D: RAHLF alimentado co efluente sintético à base peptona (600 mg.l^{-1}).

5.3.2. Análises Microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras RAHLF alimentado com efluente sintético à base de peptona são apresentados nas Tabelas de 5.3.4 a 5.3.7, e ilustrados nas Figura de 5.3.15 a 5.3.18, que contém as morfologias consideradas mais freqüentes e/ou importantes do ensaio.

Na Tabela 5.3.4 pode-se observar o predomínio de microrganismos semelhantes à *Methanosaeta sp.* ao longo de todo o reator, o que indica que a utilização da peptona como fonte de carbono permitiu a formação de todo o consórcio metanogênico desde o início do processo, por ser substrato facilmente utilizável. Arqueas hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes) também estiveram presentes em predominância ao longo de todo o reator, garantindo a retirada de moléculas de H_2 e CO_2 do meio permitindo, dessa forma, a ocorrência da acetogênese a partir da degradação do propionato formado que, nesse caso, foi o principal precursor para esse processo. Outros microrganismos fortemente presentes ao longo de todo o reator, sendo também predominantes no início e no final do mesmo, foram bacilos não fluorescentes, relacionados inicialmente com a hidrólise protéica e, posteriormente, com o processo acidogênico, que ocorreu ao longo de todo o reator.

Tabela 5.3.4.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona (DQO= 400 mg./l⁻¹) como única fonte de carbono contendo concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g./l¹.

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++
<i>Methanosarcina sp.</i>	+	-	-	++	-	-	-	-	+
B. Fluorescente 1	++++	++++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++
B. Fluorescente 2	++	++++	++++	+++	++	+	++	++	++
Cocos Fluorescente	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Filamentos Fluorescente	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B. Curvo Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilos curvo 1	+	+++	++	+	++	++	+++	++	++
Bacilos curvo 2	-	+	++	+	++	-	+++	++	++
Filamento 1	+	+++	-	-	-	-	-	-	-
Filamento 2	-	+++	++	++	+++	+	++	+	+
Filamento 3	-	-	-	-	-	-	++	-	+
Bacilo 1	+	++	++	++	+	++	++	+	+
Bacilo 2	++++	++++	+	+++	++	++	++	++++	++++
Bacilo 3	++++	+++	-	++	+	+	++	++	+++
Bacilo 4	-	-	-	+	++	+	++	+	+
Bacilo 5	+	++++	++	+++	+	++	++	++	++
Espiroquetas	+	+	+	-	+	+	+	-	++
Cocobacilos	-	++	++	-	++	+	+	+++	+++
Coco 1	-	+++	-	++	+	-	+	+++	
Coco 2	-	+	++	-	-	-	-	-	++
Bacilo 6	-	-	-	+++	-	+++	+++	-	+++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.15.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona como única fonte de carbono ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$), a: → bacilo 6, b: → bacilo 2 e → bacilo 5, c: arranjo de bacilos 2, d: bacilos fluorescentes, e: → morfologia semelhante à *Methanosarcina* sp., f: fluorescência da foto e.

Na Figura 5.3.15 (a) pode-se observar um microrganismo pouco comum em outras condições de operação, um bacilo com cerca de $20 \mu\text{m}$ de comprimento. Esses bacilos foram visualizados nos pontos 4, 6, 7 e 9 de amostragem, não emitem fluorescência e provavelmente

estão relacionados com o processo de fermentação dos aminoácidos e geração de ácidos. Microrganismos semelhantes à *Methanosarina sp.* foram visualizados nos pontos 4 e 9 do reator e podem ser observados na Figura 5.3.15. (e) e (f).

Na Tabela 5.3.5. são observadas as frequências de aparição dos microrganismos mais importantes ao longo do reator, após dez dias de operação com carboidratos com fonte adicional de carbono no efluente sintético. Comparando-se com a condição anterior, pode-se observar um ligeiro aumento na frequência de aparição de morfologias semelhantes a *Methanosaeta sp.* e um aumento considerável no ponto de amostragem número 6 de morfologias semelhantes à *Methanosarcinas sp.* Na Figura 5.3.2 pode-se observar que o pico de concentração de ácido acético se dá no ponto de amostragem número 4 e começa a realmente decair a partir do sexto ponto de amostragem, o que torna muito coerente que a frequência de aparição das morfologias semelhantes à *Methanosarcinas sp.* aumentem sensivelmente no sexto ponto de amostragem. A somatória das constantes de formação de ácido acético resulta em um valor 12,5 % maior na condição operacional com presença de carboidrato, o que também seria uma possível explicação para o aumento na frequência de aparição das *Methanosarcinas*. Na Figura 5.3.16 (a) pode-se observar uma ocorrência pouco freqüente em outras condições de operação, presente no início do reator alimentado com carboidratos e derivados protéicos. Vários bacilos (curvos ou não) apareceram envoltos a uma “capa” transparente. Na foto (b), pode-se visualizar um bacilo curvo grande, em tamanho maior do que os normalmente encontrados, associando-se em pares. As fotos (c) e (d) mostram os mesmos microrganismos, submetidos à fluorescência e a contraste de fase. Nessas fotos podem ser visualizados bacilos finos e retos que, via de regra, apresentaram fluorescência sempre que apareceram, em todas as condições operacionais estudadas. Na foto (e) tem-se uma amostra dos bacilos 3, associados a cocobacilos, morfologias muito freqüentes nesse ensaio e, finalmente, na foto (f), tem-se o outro tipo mais freqüente de bacilos fluorescentes encontrados nessa condição operacional.

Tabela 5.3.5: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético, contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.L⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	+	+	+	+	+++	++	++	-
B. Fluorescente 1	++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+
B. Fluorescente 2	+++	+++	++++	++++	+++	++	+++	++	+
Cocos Fluorescentes	++	+	-	-	-	-	-	++	++
Filamentos Fluorescentes	++	++	-	-	-	-	-	-	-
B. Curvo fluorescente	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	++	++	+	++	++	++	-	-
Bacilo curvo 2	+++	+	++	+	+	-	-	-	-
Filamento 1	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Filamento 2	+++	+	+	++++	++	+	+	-	-
Filamento 3	+++	+	-	+	-	-	-	-	-
Bacilo 1	++	++++	++	++	+	+	++	+	++
Bacilo 2	++++	+++	++	+	++	+	++	+	+++
Bacilo 3	++	+	++	+	+++	+++	++	+	++
Bacilo 4	-	++	-	-	-	-	-	-	-
Bacilo 5	++	-	-	++	-	-	-	-	-
Espiroquetas	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Cocobacilos	+++	+++	++++	-	++	+++	+	+	+++
Coco 1	+	+	+	+	++	++	-	+	++
Coco 2	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Bacilo 6	++	+	-	-	+	++	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.16.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono. a: bacilos envoltos a “capas” transparentes; b: bacilos curvos grandes; c: contraste de fase da foto d; d: bacilos retos e finos fluorescentes; e: bacilos 3 em associação com cocobacilos; e f: bacilos fluorescentes 2.

Após a adição de lipídeos, nota-se que houve uma sensível diminuição microrganismos semelhantes a *Methanosaeta sp.*, *Methanosarcinas sp.* e arqueas metanogênicas hidrogenotróficas (bacilos fluorescentes). Tal fato contribui para reforçar a hipótese de os

lipídeos realmente originarem produtos tóxicos às metanogênicas no decorrer do processo de sua degradação. Nota-se, também, um ligeiro aumento de bacilos não fluorescentes, o que condiz com o aumento da carga de produtos fermentáveis e um sensível aumento de bacilos curvos semelhantes a *Dessulfovibrio sp.* Estes organismos estariam ligados ao processo de fermentação de lipídeos na ausência de sulfato no início do reator (Vourdoow, 1995) e com o consumo de ácido acético no final do mesmo (Lens *et al*, 1998). Na Figura 5.3.17, tem-se ilustradas algumas das morfologias mais importantes encontradas nesse ensaio. Nas fotos (a) e (b) tem-se morfologias semelhantes a *Methanosarcinas sp.* e bacilos fluorescentes. As fotos referem-se a observações sob contraste de fase e fluorescência, respectivamente. Na foto (c), tem-se uma amostra de bacilos 3 associados a cocobacilos, morfologias estas que estiveram sempre presentes ao longo dessa condição operacional. Na foto (d), tem-se cocos não fluorescentes e, finalmente, nas fotos (e) e (f) tem-se os mesmos microrganismos observados sob contraste de fase e fluorescência, sendo eles bacilos e cocos fluorescentes.

Tabela 5.3.6: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g.l⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Archaea</i>									
<i>Methanosaeta sp</i>	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++++	++++
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	-	+	+	-	+	+	++	+
B. Fluorescente 1	+++	+	++	++++	++	+	+++	+	++
B. Fluorescente 2	+++	+++	++	+	++	+	+++	+++	++
Cocobacilo Fluorescente	-	-	-	+	++++	++	+++	-	-
Cocos Fluorescentes	-	-	++	++	-	+	+	+	+
Filamentos Fluorescentes	+	++	+	++	-	+	+	-	-
B. curvo fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio									
<i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	+++	++	+	-	++	++	+++	+++
Bacilo curvo 2	+++	+	-	+	+	-	-	-	-
Filamento 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Filamento 2	+++	++	+++	-	-	-	+	-	++
Filamento 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Bacilo 1	+	+	+	++	-	+	+	+	-
Bacilo 2	++++	+++	++	++	+	+++	++++	+	++
Bacilo 3	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Bacilo 4	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Bacilo 5	+	-	+	-	+++	++	-	-	-
Cocobacilos	+++	++++	+++	+++	+++	++	++	+	+++
Coco 1	+	++	++	+	-	-	+++	-	-
Coco 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Após a retirada dos lipídeos e carboidratos e do aumento da carga de derivados protéicos no efluente sintético, pôde-se constatar que ocorreu o colapso total do reator no que se refere à metanogênese. As observações ao microscópio comprovaram esse fato, tendo-se constatado a diminuição drástica na frequência de aparecimento de microrganismos semelhantes a *Methanosaeta sp.* e o desaparecimento de microrganismos semelhantes à *Methanosarcinas sp.* Os bacilos fluorescentes predominaram ao longo de todo o reator. Todavia, o que mais chamou a atenção foi a predominância de microrganismos semelhantes a *Dessulfovíbrio sp.* É possível que o processo de seleção natural, ocorrido no reator ao longo das condições operacionais estudadas e a elevada concentração de ácido acético ($\sim 220 \text{ mg.l}^{-1}$), tenham favorecido o crescimento desses microrganismos em detrimento das arqueas metanogênicas acetoclásticas. Segundo Lens *et al.* (1998), estes microrganismos têm velocidade de crescimento sempre inferior às redutoras de sulfato. Infelizmente, nada pode ser inferido acerca das rotas metabólicas utilizadas nesse processo, pois o modelo cinético proposto não se ajustou aos dados experimentais justamente devido ao acúmulo dos ácidos acético e propiônico, não previsto em sua concepção. Na Figura 5.3.18, tem-se ilustrados, nas fotos (a) e (b), os bacilos curvos que predominaram ao longo de todo o reator; na foto (c), cocobacilos, também muito freqüentes ao longo do ensaio, todavia com estruturas brilhantes em seu interior não observadas comumente nas outras condições operacionais. Na foto (d), têm-se cocos não fluorescentes comumente observados em outras condições operacionais, associados normalmente a processo fermentativo dos aminoácidos; e nas fotos (e) e (f), tem-se os bacilos fluorescentes mais comuns ao longo do reator nessa condição operacional.

Figura 5.3.17.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos como única fonte de carbono. a e b: morfologias semelhantes a *Methanosarcina sp.* e bacilos fluorescentes; c: bacilos 3 associados com cocobacilos; d: cocos não fluorescentes; e e f: bacilos cocobacilos fluorescentes.

Tabela 5.3.7.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona (DQO = 600 mg./l⁻¹) como única fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 1 g./l⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	+	+	++	++	++	++++	+	+	++
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	-		-	-	-	-	-	-
B. Fluorescente 1	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++	+	++
B. Fluorescente 2	+	+	+	+	+	++++	++	+	+
C. Fluorescente	+	-		-	-	-	-	-	-
Filamentos Fluorescente	+	+		-	-	-	-	-	-
B. Curvo Fluorescente	-	+		-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	++++	++++	++++	++++	++++	++	+++	+++	++++
Bacilo curvo 2	++	+++	+	++	++	+	+	+	+
Filamento 1	+	++	++	++	-	-	-	-	-
Filamento 2	++	++	+	+	++	-	-	+	+
Filamento 3	+	+++	+	++	-	-	-	-	-
Bacilo 1	++	+++	+	++	+	++	++	+	+
Bacilo 2	+++	+++	++++	++++	+++	+++*	+++*	++	+
Bacilo 3	+	+++	++	++	+++	++	++	+	+++
Bacilo 4	+	++	+	+	-	-	-	-	-
Bacilo 5	++	+	-	+	-	-	-	-	-
Espiroquetas	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cocobacilos	+	+	+	+	+++	+	+	-	++++
Coco 1	+	-	+	+	+	++	++	-	+++
Coco 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.18.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 600 mg. l^{-1}). a e b: bacilos curvos; c: cocobacilos esporulados; d: cocos; e e f: bacilos fluorescentes.

Os microrganismos atuantes no experimento em que se utilizou efluente sintético à base de peptona e com concentração afluenta de bicarbonato igual a 400 mg. l^{-1} foram submetidos às análises de microscopia de rotina e também à análise de hibridação florescente *in situ*. O intuito desse ensaio foi quantificar a proporção de microrganismos do Domínio *Archaea* e *Bacteria* ao

longo do reator nas condições de operação onde a peptona foi utilizada como única fonte de carbono (D.Q.O. = 400 mg.l⁻¹), primeira condição operacional, e também na presença de seus co-substratos, carboidratos e lipídeos, segunda e terceira condições operacionais. Nas análises de FISH, foram conseguidos bons resultados somente com as amostras retiradas no início do reator. Dessa forma, têm-se resultados para os dois primeiros pontos de amostragem do reator no ensaio com peptona como fonte de carbono; para os quatro primeiros pontos de amostragem do reator alimentado com peptona e carboidratos; e para os três primeiros do reator alimentado com peptona, carboidratos e lipídeos. Os microrganismos provenientes dos pontos de amostragem subsequentes se apresentaram em grumos, impedindo a contagem de células e impossibilitando o cálculo percentual. Nas duas primeiras condições de operação, os microrganismos puderam ser visualizados até que dois terços da concentração de hidrolisados protéicos e quase toda a concentração de carboidratos, aproximadamente tivessem sido consumidos. Por outro lado, na presença de lipídeos, somente cerca de 55% da concentração de derivados protéicos havia sido consumida e quase a totalidade de carboidratos, até o ponto onde os microrganismos puderam ser visualizados. Segundo Madigan *et al.* (1997), os microrganismos tendem a se associar, na formação de grânulos ou mesmo de biofilmes, para otimizar condições de sobrevivência, quando expostos a condições desfavoráveis. Pode-se inferir que a formação de grumos nas duas primeiras condições esteja ligada à baixa concentração de matéria orgânica presente no meio, já que, nos dois casos, as concentrações de derivados protéicos e de ácidos voláteis eram semelhantes a partir do ponto de amostragem onde os grumos estiveram presentes. Na terceira condição de operação, a mesma concentração não se repete, pois o processo de degradação de derivados protéicos não transcorreu de maneira tão rápida quanto nas primeiras condições de operação, sendo que a concentração de ácidos também se mostrou muito superior. É importante considerar, contudo, o efeito negativo causado pela presença de lipídeos em todas as condições operacionais nas quais este composto esteve presente. Portanto, pode-se supor que, nesse caso, a formação dos grumos não tenha ocorrido devido à escassez de substrato e sim devido ao possível efeito negativo causado pelos lipídeos, ou seus produtos de hidrólise, sobre a microflora. As Tabelas de 5.3.8 a 5.3.11 apresentam a frequência relativa de aparição dos microrganismos baseada nas análises de microscopia óptica de contraste de fase e fluorescência. As Figuras 5.3.21, 5.3.25 e 5.3.29 apresentam os gráficos de abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338), sendo que as barras indicam o erro padrão. As Figuras 5.3.19, 5.3.23 e 5.3.27 mostram, na coluna da esquerda, o total de microrganismos ativos, microrganismos corados com DAPI (coloração azul) e, na coluna da direita, a mesma

foto com microrganismos corados com a sonda específica para o Domínio *Archaea* (coloração vermelha). As Figuras 5.3.20, 5.3.24 e 5.4.28 mostram, da mesma forma, microrganismos corados com DAPI e as mesmas fotos com microrganismos corados com a sonda específica para o Domínio *Bacteria*. As Figuras 5.3.23, 5.3.26, 5.3.30 e 5.3.31 ilustram os microrganismos considerados mais importantes ao longo das condições operacionais estudadas, expostos à microscopia de contraste de fase e auto-fluorescência.

Figura 5.3.19: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbico de leito fixo alimentado com peptona. (a) e (c) coloração com DAPI, (b) e (d), células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b), relacionados ao ponto 1 de amostragem, e (c) e (d), relacionados ao ponto 2.

Figura 5.3.20: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbico de leito fixo alimentado com peptona. (a) e (c) coloração com DAPI, (b) e (d) células hibridadas com a sonda EUB338. Pares (a) e (b), relacionados ao ponto 1 de amostragem, e (c) e (d), relacionados ao ponto 2.

No primeiro ponto de amostragem do reator, submetido à primeira condição de operação, os microrganismos relacionados ao Domínio *Archaea* representaram 60,8 % do total de microrganismos contados, enquanto que os relacionados ao Domínio *Bacteria*, 52,9%. Os erros padrões associados a essas medidas foram de 1,5 % e 1,7 %, respectivamente. No segundo ponto de amostragem a porcentagem relativa ao Domínio *Arquea* foi de 69, 3%, com erro padrão associado de 1,9%, e ao Domínio *Bacteria* de 32,3%, com erro de 1,3%. Em ambos os pontos, as células hibridadas com a sonda ARC915 foram principalmente bacilos retos pequenos e células semelhantes a *Methanosaeta*, enquanto que as hibridadas com a sonda EUB338 foram bacilos curvos, bacilos ovalados e bacilos retos com extremidades arredondadas. Esses valores podem ser mais bem visualizados na Figura 5.3.19, e condizem com a frequência relativa apresentada na Tabela 5.3.8., que indica que as morfologias associadas às arqueas metanogênicas sempre predominaram sobre os bacilos não fluorescentes, relacionados às bactérias hidrolíticas, nos dois primeiros pontos do reator.

Figura 5.3.21: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona como fonte de carbono.

Na verdade, na Tabela 5.3.8, pode-se observar o predomínio das arqueas ao longo de praticamente todo o reator, enquanto que o predomínio de bacilos aparece somente no sexto ponto de amostragem, onde também se tem a presença expressiva de cocos não fluorescentes. Bacilos curvos também aparecem como morfologias predominantes no primeiro ponto do reator, enquanto que filamentos encontram-se fortemente presentes no terceiro ponto de amostragem. É importante citar que a Tabela 5.3.8, assim como todas as outras desse tipo, presentes nesse trabalho, é produto de uma análise totalmente abstrata, por não ter sido feita a contagem de microrganismos, sendo, portanto, dependente totalmente do observador. No entanto, as percentagens presentes na Figura 5.3.21, apesar de também dependerem do observador, podem ser consideradas resultados mais precisas, por serem provenientes de procedimento de contagem.

Na Figura 5.3.22 se encontram ilustradas as morfologias consideradas mais importantes dessa condição operacional.

Tabela 5.3.8.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona (DQO = 400 mg./l⁻¹) como única fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg./l⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio Archaea	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	-	++++
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	-	++	+	++	+	-	-	++
Bacilos Fluorescentes 1	++++	++++	+++	++++	++	++++	+++	-	+++
Bacilos Fluorescentes 2	++++	++++	+++	++++	++	++++	+++	-	+++
Cocos Fluorescente	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Filamentos Fluorescente	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Bacilo Curvo Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio Bacteria									
Bacilos curvos 1	++++	++	++	++	+	++	++	-	++
Bacilos curvos 2	++++	++	++	++	+	++	++	-	++
Filamentos 1	++	++	+++	++	+	+	+	-	+
Filamentos 2	++	+++	+++	++	++	+	+	-	+
Filamentos 3	++	++	+++	++	++	+	+	-	+
Bacilos 1	+	++	++	++	+++	++++	+++	-	++
Bacilos 2	+++	++	++	++	+++	++++	+++	-	++
Bacilos 3	+++	++	++	++	+++	++++	+++	-	++
Bacilos 4	+	++	+	++	+++	++++	+++	-	++
Bacilos 5	+	++	+	++	+++	++++	+++	-	++
Espiroquetas	++	+	-	-	+	+	+	-	-
Cocobacilos	+	++	++	++	+	+	++	-	+
Cocos 1	+	-	-	++	++	+++	++	-	++
Cocos 2	+	-	-	++	++	+++	++	-	++
Protozoário	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.22.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona como única fonte de carbono ($DQO = 400 \text{ mg.l}^{-1}$), com concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l^{-1} . a: bacilos 2 e 3 e b: bacilos e espiroquetas; c e f: bacilos fluorescentes; d e e: bacilos e filamentos semelhantes a *Methanosaeta sp.*

Nas amostras coletadas ao longo dos quatro primeiros pontos de amostragem do reator submetido à segunda condição de operação, as morfologias das células hibridadas com as sondas ARC915 e EUB338 foram as mesmas citadas na primeira condição operacional, ilustradas nas Figuras 5.3.23. e 5.3.24, respectivamente.

Figura 5.3.23: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidrato. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI; (b), (d), (f) e (h) células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; (e) e (f) correspondentes ao ponto 3; e (g) e (h) correspondentes ao ponto 4.

Figura 5.3.24: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos com fonte de carbono. (a), (c), (e) e (g) coloração com DAPI. (b), (d), (f) e (h) células hibridadas com a sonda EUB338. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; (e) e (f) correspondentes ao ponto 3 e (g) e (h) correspondentes ao ponto 4.

As porcentagens de organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram 41,3% (erro padrão = 1,4%), 46,3% (erro padrão = 1,1%), 61,7% (erro padrão = 1,8%) e 61,8% (erro padrão = 1,7%) nos pontos de amostragem 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Para os mesmos pontos, as porcentagens de organismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* foram 58,3% (erro padrão = 1,3%), 57,4% (erro padrão = 1,3%), 41,5% (erro padrão = 2,4%) e 37,1% (erro padrão = 1,6%), respectivamente. Esses valores encontram-se ilustrados na Figura 5.3.25

Figura 5.3.25: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbico de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono.

Pode-se notar o aumento de microrganismos do Domínio *Archaea*, ao longo dos quatro primeiros pontos de amostragem, e o decréscimo dos microrganismos do Domínio *Bacteria* nos mesmos pontos. Esses dados podem ser correlacionados com a Tabela 5.3.9, levando-se em consideração sua composição abstrata. A Figura 5.3.10., que ilustra os perfis de concentração de derivados protéicos, carboidratos e de ácidos voláteis nessa condição de operação, mostra que os valores das concentrações acumuladas de ácido acético aumentaram até o terceiro ponto, devido à ação das bactérias hidrolíticas acidogênicas e acetogênicas, propiciando, dessa forma, condições para o crescimento da porcentagem de arqueas metanogênicas, como o ilustrado na Figura 5.3.25.

Na Figura 5.3.26 encontram-se ilustradas algumas das morfologias presentes nessa condição operacional, com destaque para os cocos que se mostraram claramente presentes no ponto 4 e formavam cadeias.

Tabela 5.3.9.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg./⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	++	++++	++++	++++	++	++	++++	++++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>	-	+	-	-	+	+	++	++	-
B. Fluorescente 1	+++	++++	++	++	-	+	+	+	+
B. Fluorescente 2	++	++++	++++	+++	++	+	+++	++	+
Cocos Fluorescentes	++	-	-	-	-	-	-	++	++
Filamentos Fluorescente	++	-	-	-	-	-	-	-	-
B. Curvos Fluorescentes	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo Curvo 1	++++	++	++	-	++	++	++	+	+
Bacilo Curvo 2	++	++	++	-	++	++	++	+	+
Filamento 1	+	-	++	++	+	-	-	-	-
Filamento 2	++	++	++	++	+	-	-	-	-
Filamento 3	+	-	++	++	+	-	-	-	-
Bacilo 1	++	++	+	++	+	+	++	+	++
Bacilo 2	++	++	++	++++	+	+	-	-	-
Bacilo 3	++	+++	++	++++	++	++	++	+	++
Bacilo 4	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Bacilo 5	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Espiroquetas	++	+	-	-	+	-	-	-	-
Cocobacilos	++	++	++	++++	++	++	++	+	++
Coco 1	++	+	+	++++	++	++	+	+	++
Coco 2	+	-	-	+	-	-	-	+	++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.2.26.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg.l^{-1}). a: bacilos não fluorescentes; b e d: bacilos fluorescentes; c: cocos não fluorescentes formadores de cadeia; e: contraste de fase da foto f; e f arranjo de bacilos pequenos retos e finos que apresentaram fluorescência.

Após a introdução dos lipídeos, as porcentagens de organismos pertencentes ao Domínio *Archaea* foram 38,7% (erro padrão = 1,3%), 44,8% (erro padrão = 1,1%), 55,1% (erro padrão = 2,7%) nos pontos 1, 2 e 3, respectivamente. Para o Domínio *Bacteria*, as porcentagens foram 60,5% (erro padrão = 1,7%), 55,9% (erro padrão = 1,7%) e 41,5% (erro padrão = 2,4%) também

nos pontos 1, 2 e 3, respectivamente. As morfologias das células hibridadas com as sondas ARC915 e EUB338 foram as mesmas observadas nas condições anteriores e se encontram ilustradas nas Figuras 5.3.27 e 5.3.28.

Figura 5.3.27: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos. (a), (c) e (e) coloração com DAPI; (b), (d) e (f) células hibridadas com a sonda ARC915. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; e (e) e (f) correspondentes ao ponto 3.

Figura 5.3.28: Hibridação *in situ* das amostras do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos com fonte de carbono. (a), (c) e (e) coloração com DAPI; (b), (d) e (f) células hibridadas com a sonda EUB 338. Pares (a) e (b) correspondentes ao ponto 1; (c) e (d) correspondentes ao ponto 2; e (e) e (f) correspondentes ao ponto 3.

Pode-se notar a mesma tendência de crescimento de arqueas e diminuição de bactérias observada na condição operacional anterior. Todavia, a porcentagem de arqueas no ponto três é cerca de 6,5 pontos percentuais menor do que a porcentagem dos mesmos organismos na condição operacional onde a fonte de carbono foi composta por carboidratos e derivados protéicos. Essa diminuição está ligada, provavelmente, ao efeito negativo causado pelos lipídeos. No caso dessa condição operacional, a diminuição da frequência das morfologias ligadas ao Domínio *Bacteria* não está representada nos dados da Tabela 5.3.10, que as considera constante. Todavia, o aumento de morfologias associadas ao Domínio *Archaea* pode ser notado.

Figura 5.3.29: Abundância relativa de células pertencentes aos Domínios *Archaea* (ARC915) e *Bacteria* (EUB338) retiradas do reator horizontal anaeróbio de leito fixo alimentado com efluente sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.

De maneira geral, comparando-se os resultados de frequência relativa provenientes das análises de FISH e das observações ao microscópio óptico, foi possível concluir que, na impossibilidade da realização da técnica do FISH, as observações ao microscópio óptico podem fornecer bons resultados, os quais, todavia, devem ser interpretados com cuidado, somente como estimativa de frequência, devido à sua natureza abstrata.

A Tabela 5.3.10. evidencia que os microrganismos associados ao processo fermentativo acidogênico, se não predominaram, mostraram-se claramente abundantes ao longo de todo o reator. Tais microrganismos encontram-se ilustrados na Figura 5.3.30, nas fotos a, c, d e e, com destaque para os cocobacilos que se mostraram firmemente presentes nessa condição operacional como em nenhuma outra mais (foto e). Na foto f, tem-se uma amostra dos microrganismos metanogênicos hidrogenotróficos observados que, além dos bacilos normalmente encontrados, eram constituídos por morfologias de estrutura irregular (pequenos filamentos esguios). Na foto b, tem-se presença de um grande filamento e, na foto d, em associação com os bacilos, tem-se uma morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*

Tabela 5.3.10.: Frequência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona e carboidratos e lipídeos como fonte de carbono (concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg./⁻¹).

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta</i> sp	+++	+++	++++	+++	++++	++	++++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. Fluorescente 1	+	+	++	++	++	+	+++	+	+
B. Fluorescente 2	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++	+++	+++
Cocos Fluorescentes	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Filamentos Fluorescentes	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B. Curvo Fluorescente	-	+++	+++	++	++	++	+	+	+
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo Curvo 1	+++	++	++	++	+	++	++	+	+
Bacilo Curvo 2	+	++	+	++	++	++	++	+	+
Filamento 1	-	-	++	+	+	+	+	+	+
Filamento 2	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Filamento 3	-	+	++	+	+	+	+	+	+
Bacilo 1	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
Bacilo 2	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
Bacilo 3	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	+++
Bacilo 4	+++	+++	++	+	+	++	+	+	+
Bacilo 5	++	++	+	+	+	++	+	+	+
Espiroquetas	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Cocobacilos	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	-
Coco 1	+	+	+	-	++	++	++	+	-
Coco 2	+	+	+	+	++	++	-	-	-
Protozoário	-	-	-	-	-	+	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.30.: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona, carboidratos e lipídeos (concentração de bicarbonato afluyente igual a 400 mg.l^{-1}). a: bacilos 1 não fluorescentes, alguns ainda com “capa” transparente; b: grande filamento; c: bacilos 2 não fluorescentes e bacilos curvos; d: morfologia semelhante à *Methanosaeta* sp.; e: cocobacilos; e f: bacilos fluorescentes.

Nas amostras retiradas do reator submetido à quarta condição de operação, não foram realizadas análises de hibridação fluorescente *in situ*, pois o objetivo do ensaio com FISH foi verificar a influência da adição de carboidratos e lipídeos ao efluente protéico, na porcentagem

de microrganismos relacionados aos Domínios *Arquea* e *Bacteria*. Realizaram-se, entretanto, as análises de microscopia ópticas de contraste de fase e autofluorescência (Figura 5.3.31) e construí-se a Tabela (5.3.11) de frequência relativa de aparição de microrganismos.

Nessa condição operacional, os bacilos não fluorescentes, relacionados ao processo hidrolítico acidogênico e acetogênico, predominaram até o terceiro ponto e depois no sexto ponto de amostragem. Pode-se observar na Figura 5.3.12 que, até o sexto ponto de amostragem, ainda ocorre o decaimento da concentração de derivados protéicos. Após tal ponto, a concentração de derivados protéicos se torna praticamente constante e muito baixa (considerada residual), justificando a predominância ou forte presença de tais microrganismos nos citados pontos de amostragem. Nos pontos de amostragem subsequentes, onde o processo predominante foi a degradação de ácidos voláteis, tais morfologias mostraram-se também fortemente presentes. Houve predomínio de morfologias relacionadas o processo metanogênico hidrogenotrófico nos pontos de amostragem 1, 2, 4 e 7. Tais morfologias mostraram-se fortemente presentes nos outros pontos, com exceção dos pontos 5 e 6.

Sendo a peptona um substrato de fácil degradação, a possibilidade de elevação da pressão parcial de hidrogênio a tal ponto de inviabilizar o processo era muito grande. Por isso, a presença de tais microrganismos foi de extrema importância para o processo de degradação anaeróbia de derivados protéicos, atuando na retirada de H_2 e CO_2 do meio. Outros microrganismos predominantes foram os relacionados com *Methanosaeta sp.* Tal predominância se deu nos pontos 3, 5 e 7, sendo que, nos outros pontos, a partir do segundo, esses microrganismos se mostraram claramente presentes. Um fato importante a ser ressaltado foi a ausência do predomínio de bacilos curvos, como ocorreu na quarta condição de operação com concentração afluyente de bicarbonato igual à 1000 mg.l^{-1} , quando a metanogênese entrou em colapso. Essas morfologias só se mostraram fortemente presentes no primeiro ponto de amostragem, onde os processos hidrolítico acidogênico foi provavelmente predominante, juntamente com o metanogênico hidrogenotrófico. Pode-se concluir que a diminuição da concentração de bicarbonato de sódio contribuiu decisivamente na formação de consórcio microbiano equilibrado e capaz de levar a cabo o processo metanogênico como um todo.

Tabela 5.3.11.: Freqüência relativa das morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) como única fonte de carbono e concentração de bicarbonato aflente igual a 400 mg.l⁻¹.

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaeta sp</i>	++	+++	++++	+++	++++	++	++++	+++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>									
B. Fluorescente 1	++++	++++	+++	++++	++	++	++++	+++	+++
B. Fluorescente 2	++++	++++	+++	++++	++	++	++++	+++	+++
Cocos Fluorescente	-	-	-	++	-	-	-	-	-
Filamentos Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. Curvo Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	++	++	++	++	++	++	+	+
Bacilo curvo 2	+++	++	++	++	++	++	++	+	+
Filamento 1	++	-	++	+	-	-	+	-	-
Filamento 1	++	-	++	+	-	-	+	-	-
Filamento 1	++	-	++	+	-	-	+	-	-
Bacilo 1	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++
Bacilo 2	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	+++	+++
Bacilo 3	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	+++	++
Bacilo 4	++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++
Bacilo 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espiroquetas	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Cocobacilos	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	-
Coco 1	+	+	+	++	++	++	++	++	-
Coco 2	+	+	+	++	+	++	++	++	-
Protozoário	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.3.31: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo peptona como única fonte de carbono (DQO = 600 mg. l^{-1}) com concentração de bicarbonato afluente igual a 400 mg. l^{-1} . a: bacilos não fluorescentes; b e d: bacilos fluorescente; c: morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*; e: bacilos e vibrios; e f: bacilos, bacilos curvos e cocos fluorescentes.

5.4. Caseína

5.4.1. Modelagem e Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.

Nesse sub-item, serão apresentadas cinco condições de operação utilizando caseína como fonte de proteínas. Na primeira condição, o RAHLF foi operado com efluente sintético contendo somente caseína como fonte de carbono, com DQO de, aproximadamente, 400 mg. l^{-1} . Esse foi o primeiro ensaio realizado na etapa experimental do presente trabalho e tinha, como principal objetivo, determinar o tempo de detenção hidráulica mais apropriado para a realização de todos os experimentos. Em consequência disso, o reator foi operado durante 15 dias com tempo de detenção hidráulica de 8 horas, 15 dias com tempo de detenção hidráulica de 6 horas e 35 dias com tempo de detenção hidráulica de 4 horas. Após esse período, optou-se pela utilização do menor tempo de detenção hidráulica e realizou-se a coleta e análise das amostras para a obtenção dos perfis de concentração do substrato e dos produtos metabólitos intermediários.

A produção de alcalinidade total foi praticamente constante por volta de 132,02 mg $CaCO_3.l^{-1}$. Esse reator foi então descartado, pois já se encontrava com regime hidrodinâmico comprometido pela produção elevada de polímeros extracelulares.

O reator foi re-inoculado e operado novamente com caseína como única fonte de carbono, durante 28 dias para adaptação da biomassa. Nessa condição, a produção de alcalinidade total foi semelhante à anterior, constante, e com valores por volta de 129,06 mg. l^{-1} . Posteriormente, adicionaram-se carboidratos como segunda fonte de carbono e, finalmente, lipídios. Nessas duas condições operacionais a produção de alcalinidade total foi de aproximadamente 224,61 e 21,67 mg $CaCO_3.l^{-1}$, respectivamente.

Após análise preliminar dos resultados, observou-se que a remoção de matéria orgânica no ensaio realizado utilizando caseína como única fonte de carbono e tempo de adaptação da biomassa de 28 dias foi muito inferior ao ensaio realizado com maior tempo de adaptação da biomassa. Foi formulada, então, a hipótese de que, no primeiro experimento, pudesse ter ocorrido a lise celular em intensidade suficiente para suprir as necessidades de ferro do consórcio microbiano, já que nenhuma fonte de ferro havia sido adicionada ao meio, uma vez que a caseína é uma proteína que não contém ferro em sua composição. Por esse motivo, optou-se pela verificação de uma condição diferente das normalmente testadas.

Testou-se um efluente sintético contendo caseína como única fonte de carbono, DQO de 400 mg. l^{-1} , com adição de 10 mg. l^{-1} de ferro. Nessa condição operacional, a produção de alcalinidade total foi por volta de 144 mg $CaCO_3.l^{-1}$. Os resultados obtidos nesses experimentos

encontram-se nas Figuras 5.4.1 a 5.4.4. As constantes cinéticas fornecidas pelo modelo se encontram na Tabela 5.4.1.

Figura 5.4.1.: Perfis das concentrações de proteínas e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono e tempo de adaptação da biomassa de 65 dias: proteína (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,99173.

Figura 5.4.2.: Perfis das concentrações de proteínas e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono e tempo de adaptação da biomassa de 28 dias: proteína (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), R² = 0,95779.

Figura 5.4.3: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína e carboidratos como fonte de carbono: proteína (■); carboidratos (●); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,97949$.

Figura 5.4.4: Perfis das concentrações de proteínas, carboidratos e ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono: proteína (■); carboidratos (●); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,97521$.

Figura 5.4.5: Perfis das concentrações de proteínas e de ácidos voláteis no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono e 10 mg. l^{-1} de ferro afluente: proteína (■); ácido acético (★); ácido propiônico (◆); valores previstos pelo modelo (—), $R^2 = 0,96929$.

Pode-se observar que o modelo proposto se ajustou bem aos dados experimentais. Porém, é importante observar que as concentrações dos ácidos acético, em alguns casos, e propiônico, em outros, foram superestimadas no início do reator. O que o modelo prevê é que toda a matéria orgânica degradada no início do reator é levada para ácidos, o que pode não ter ocorrido nesse caso. Na verdade, a caseína é uma proteína com baixa solubilidade em água com pH igual a sete e em condições normais de salinidade. Por meio de uma troca iônica entre íons de cálcio por íons de sódio, proposta por Bobbio & Bobbio (1992), possibilitou-se a alimentação homogênea do reator, com a caseína em suspensão, e não em solução, pois a aparência do efluente sintético era turva. Pode ter ocorrido de a suspensão de caseína ter sido parcialmente “filtrada” no complexo formado por “matrizes de poliuretano e polímeros extracelulares”, presente na primeira parte do reator, já que as condições operacionais com caseína produziram as maiores quantidades de polímeros extracelulares visíveis, com exceção da quinta condição (quando houve a adição de ferro no meio). Essa parcela retirada no leito foi provavelmente degradada mais lentamente, diminuindo a velocidade de produção do ácido acético, fenômeno este não contemplado pelo modelo. Acredita-se que tal fato não tenha invalidado o modelo devido aos baixos valores de erro encontrados. É importante citar inclusive que, no que diz respeito à saída do reator, os valores previstos pelo modelo não diferiram significativamente dos valores obtidos experimentalmente. Portanto, o ocorrido não inviabilizou a utilização do

presente modelo para a degradação anaeróbia de proteínas parcialmente solúveis em reatores com regime hidrodinâmico semelhante ao pistonado. Deve-se, todavia, utilizá-lo com mais cuidado no que diz respeito à produção dos ácidos voláteis formados a partir do processo de degradação de tais proteínas.

Na Tabela 5.4.1, encontram-se os resultados obtidos para as constantes de consumo de substrato, formação de produtos intermediários e de produtos finais. Analisando-se o valor da constante k_1^{app} , pode-se observar que a produção de ácido acético proveniente da degradação da caseína ocorreu mais rapidamente quando tal proteína se encontrava como única fonte de carbono no meio.

Tabela 5.4.1 Constantes cinéticas do modelo proposto para todas as condições estudadas com caseína como fonte de proteínas.

Fonte de carbono	$k_1^{app} (h^{-1})$	$k_2^{app} (h^{-1})$	$k_3^{app} (h^{-1})$	$k_4^{app} (h^{-1})$	$k_5^{app} (h^{-1})$	$k_6^{app} (h^{-1})$
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 65 dias	0,40	1,32	0,07	0,9	--	--
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 28 dias	0,38	0,94	0,10	0,25	--	--
Caseína + carboidratos	0,17	0,38	0,09	0,26	0,41	0,04
Caseína + carboidratos e lipídeos	0,06	0,17	0,13	0,25	0,98	-
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹ e 10 mg.l ⁻¹ de ferro)	0,21	0,20	0,24	0,54	--	--

Após a adição de carboidratos ao efluente sintético, nota-se uma sensível queda na velocidade inicial de degradação de proteínas (Tabela 5.4.2). Todavia, a eficiência global de degradação de matéria orgânica não sofreu decréscimo algum (Figura 5.4.7). O que provavelmente ocorreu foi que, na presença de carboidratos, os microrganismos utilizaram, em primeiro lugar, uma fonte de carbono mais facilmente hidrolisável. Isso pode ser facilmente observado nas Figuras 5.4.2 e 5.4.3, constatando-se que os carboidratos foram consumidos antes das proteínas. No caso da utilização de caseína como fonte de proteínas, os resultados condizem com os encontrados por Breure *et al*, (1996), que observaram piora no processo de degradação de proteínas após a adição de carboidratos ao meio em reatores descontínuos de mistura de bancada. Todavia, é importante citar que o processo de degradação de matéria orgânica como um todo não piorou. Portanto, acredita-se que a utilização de reatores de fluxo pistonado torna desnecessária a separação espacial dos processos de degradação de proteínas e de carboidratos

para a otimização da digestão anaeróbia. É provável que esse tipo de reator propicie naturalmente a ocorrência preferencial dos processos de degradação de diferentes fontes de carbono, em nichos ecológicos alocados em espaços físicos distintos dentro do reator.

Nessa condição operacional, a produção de acetato parece ter ocorrido preferencialmente via degradação de carboidratos, enquanto que a degradação de proteínas foi, aparentemente, responsável pela geração de propionato.

Tabela 5.4.2 Velocidades iniciais de degradação das proteínas nos reatores onde a caseína foi utilizada como fonte de proteínas.

Fonte de Carbono	Velocidades iniciais de degradação de proteínas (mg S.A.B. $\cdot$ l ⁻¹ .h ⁻¹)
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 65 dias	145,7
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 28 dias	148,8
Caseína + carboidratos	79,7
Caseína + carboidratos + lipídeos	58,9
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) + 10 mg.l ⁻¹ de ferro	139,5

Após a adição de lipídios, nota-se um decréscimo adicional nos valores de velocidade de degradação de proteínas. O valor da constante k_1^{app} decresceu 84% em relação às condições operacionais onde a caseína foi fonte única de carbono (primeira e segunda condições operacionais) e 65% em relação à condição com alimentação composta por proteínas e carboidratos (terceira condição operacional). O valor da constante k_3^{app} , por sua vez, manteve-se praticamente constante, e com isso, o valor da velocidade de degradação de proteínas foi realmente afetado, tendo sido reduzido em 60%, em relação às duas primeiras condições, e 25% em relação terceira condição operacional. Perle *et al.* (1995) relatam que os microrganismos participantes do processo de degradação da caseína, inclusive as arqueas metanogênicas, sofreram inibição pela presença de ácidos graxos de cadeia longa, que são metabólitos intermediários do processo de hidrólise de lipídeos. Esse fenômeno parece ter ocorrido em todas as condições onde houve a adição de lipídios no presente trabalho de pesquisa, causando a diminuição sensível da velocidade de degradação das proteínas. Também nesse caso, o acetato foi preferencialmente produzido via degradação de carboidratos, como indica o valor elevado de k_5^{app} nessa condição operacional, bem como o fato de o valor de k_4^{app} ter se mantido constante após a adição de lipídios, indicando que o processo acetogênico via degradação de propionato continuou igualmente viável após a adição dessas moléculas. Todavia, além da diminuição na velocidade de degradação de proteína, a presença de lipídios também causou a diminuição na

velocidade de consumo de acetato, provocando seu acúmulo no meio líquido e diminuindo a eficiência do processo como um todo. Vidal *et. al* (2000) estudaram a degradação de proteínas na presença de lipídios. Os autores compararam dois meios sintéticos, com iguais concentrações de carboidratos e proteínas, e concentração de lipídios diferentes (sendo a maior 97% superior à menor). Observaram efeito inibitório, devido à concentração de amônia, somente no meio com concentração menor de lipídios. Sendo a amônia produto da hidrólise protéica e da fermentação dos aminoácidos, pode-se dizer que o reator que degradou mais proteína foi o que produziu mais amônia, sofrendo, dessa forma, o efeito inibitório. Portanto, a presença dos lipídios também afetou a degradação de proteínas no trabalho dos citados autores. Apesar do ocorrido, os autores salientam que o processo como um todo melhorou devido à prevenção do acúmulo de ácidos voláteis provenientes da degradação mais lenta do meio cujo conteúdo de lipídios era maior. Tal fato não pode ser observado no presente trabalho, pois, como se pode notar na Figura 5.4.4, houve acúmulo de ácidos voláteis, que ocasionou baixa eficiência do processo como um todo.

Comparando-se as três condições operacionais nas quais o reator foi alimentado somente com caseína como fonte de carbono (primeira, segunda e quinta), pode-se observar que, nas duas primeiras condições operacionais, os valores das constantes k_1^{app} e k_3^{app} foram aproximadamente iguais, originando velocidades semelhantes de degradação de proteínas. Pode-se afirmar, portanto, que, no reator contínuo de fluxo pistonado ensaiado, o maior tempo de adaptação da biomassa não foi determinante para o aumento da velocidade de degradação da caseína, contrariamente ao observado por Perle *et al.* (1995) em reatores em batelada. Por outro lado, na quinta condição operacional, o valor de k_1^{app} apresentou-se 46% inferior e o de k_3^{app} aumentou 66%, indicando que, após a adição de ferro, houve uma mudança na rota metabólica de produção de ácidos, o que manteve praticamente constante o valor da velocidade de degradação de proteínas. É importante citar que o reator encontrava-se totalmente preenchido por polímeros extracelulares em seu primeiro terço quando foi alimentado com efluente sintético suplementado com ferro, sendo que o leito apresentava coloração esbranquiçada característica. Após dez dias de operação com suplementação do citado metal, a coloração esbranquiçada foi substituída pela cor negra, característica dos consórcios metanogênicos. Quando o reator foi aberto, observou-se a ausência de polímeros extracelulares no interior do leito e presença de pequenos precipitados semelhantes a sulfeto férrico. Com essa observação, pode-se dizer que o decréscimo na constante k_1^{app} (conversão da proteína a ácido acético) e a mudança da rota metabólica de produção de ácidos, pode ter sido decorrente do consumo dos polímeros extracelulares que, nesse caso, funcionaram como fonte alternativa de carbono para a biomassa. Todavia,

comparando-se, ainda, essas três condições operacionais, o mais importante a ser ressaltado diz respeito aos valores das constantes k_2^{app} e k_4^{app} . Ambas apresentaram valores significativamente superiores na condição em que o reator foi submetido à adaptação por período de tempo mais longo. Em relação à constante k_2^{app} , pode-se dizer o consumo de ácido acético foi favorecido no reator que se apresentava mais bem adaptado, o que explica os melhores valores de eficiência de degradação da matéria orgânica. Com relação à constante k_4^{app} , pode-se afirmar que a conversão de ácido propiônico a acético foi também favorecida no reator mais bem adaptado, sugerido que o processo de degradação anaeróbia da caseína tenha ocorrido realmente de maneira mais estável nessa condição operacional.

É importante citar que, após a aquisição dos resultados, concluiu-se que a presença de ferro não auxiliou no processo de degradação da proteína, contrariando as expectativas. Apesar do aumento de 46% no valor da constante k_4^{app} , o baixo valor da constante k_2^{app} mostra que o processo não foi capaz de degradar o ácido acético, como foi verificado nas condições sem suplementação de ferro, com exceção da condição quando o efluente sintético continha lipídeos. Embora a caseína seja uma proteína carente de ferro em sua estrutura, ou mesmo que não possua tal elemento em sua origem (leite), acredita-se que, como a biomassa se encontra em equilíbrio dinâmico de crescimento dentro do reator, os microrganismos ativos utilizem o ferro proveniente de microrganismos inativos para a realização de suas funções vitais. Entretanto, deve-se salientar que a adição de ferro ocorreu 20 dias após a retirada dos lipídios do efluente sintético e, como discutido anteriormente, a biomassa metanogênica acetoclástica mostrava indicações seguras de ter sido prejudicada devido à ação dos intermediários do processo de hidrólise dos lipídios. Essa biomassa pode não ter tido tempo para recuperação, resultando no baixo valor obtido para a constante de consumo de ácido acético. Como será mais bem discutido posteriormente no item sobre análise microbiológicas, a biomassa sofreu grande modificação com as mudanças nas condições operacionais. Portanto, o inóculo inicial não pode ser considerado idêntico nos dois ensaios. Além disso, nota-se que, de maneira semelhante ao ocorrido na primeira condição operacional, o residual de ácido propiônico foi baixíssimo após a adição da fonte suplementar de ferro. A presença desse residual baixíssimo e o aumento da constante k_4^{app} , em relação à condição anterior (efluente sintético com lipídios), causaram o aumento da concentração de acetato disponível, que pode ter se acumulado no meio líquido ainda devido ao efeito negativo causado pela presença de lipídios nas arqueas acetoclásticas, que possuem tempo de replicação muito alto. Dessa forma, acredita-se que mais ensaios devam ser realizados para concluir se fonte adicional de ferro melhora ou não o processo de degradação da caseína.

Nas Figuras 5.4.6 e 5.4.7, são apresentados os perfis temporais de concentração de nitrogênio amoniacal e de matéria orgânica (DQO), obtidos ao longo do reator, nas quatro condições operacionais ensaiadas. Em todas essas condições operacionais, a porcentagem de degradação de proteínas foi muito superior à porcentagem de degradação de matéria orgânica. Na pior condição operacional, ou seja, na presença de lipídios, obteve-se degradação de matéria orgânica de 46% e degradação de proteínas de 85%. Como essa condição operacional apresentou o maior residual de proteínas, realizou-se experimento de SDS-PAGE para verificação do processo de degradação de proteínas ao longo do reator. O que se pôde notar foi ausência de bandas predominantes já no primeiro ponto de amostragem, indicando que a presença de peptídeos com peso molecular inferior a 10 kDa, cerca de um terço do peso molecular do polímero original. Com isso conclui-se que a proteína já havia sido hidrolisada no primeiro segmento do reator. Pode-se afirmar que os residuais de proteína encontrados nessa condição operacional não eram compostos por proteínas íntegras. Todavia, análises de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) também não mostraram concentração significativa de nenhum aminoácido presente nas amostras ao longo do reator, o que permite concluir que o residual era provavelmente composto por peptídeos, nem por aminoácidos e nem por proteínas. Portanto, o processo de hidrólise parece ter sido interrompido ou dificultado em alguma região do reator afetada pela concentração dos ácidos graxos de cadeia longa.

Os valores finais de concentração de nitrogênio na forma amoniacal são condizentes com a elevada taxa de degradação da caseína presente em todas as condições testadas, cabendo ressaltar o menor valor acumulado para a quarta condição operacional, cujo efluente sintético continha lipídeos.

Figura 5.4.6. Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniaca no RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de proteínas: caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹ e 65 dias de operação) (*); caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹ e 28 dias de operação) (■); caseína e carboidratos (●); caseína, carboidratos e lipídeos (▲); e caseína (DQO = 400 mg.l⁻¹) e 10 mg.l⁻¹ de ferro (◆).

Figura 5.4.7.: Perfis de DQO nas cinco condições operacionais onde a caseína foi utilizada como fonte de proteínas, A: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína (400 mg.l⁻¹) - tempo de operação igual à 65 dias; B: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína (400 mg.l⁻¹) - tempo de operação igual à 28 dias; C: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína e carboidratos; D: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína, carboidratos e lipídeos; e E: RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína (400 mg.l⁻¹) e com 10 mg.l⁻¹ de ferro adicionados ao meio.

5.4.2. Análises Microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína como fonte de proteínas são apresentados nas Tabelas de 5.4.3. a 5.4.6. e ilustrados nas Figuras de 5.4.8. a 5.4.11.. As amostras do reator suplementado com ferro não foram analisadas ao microscópio óptico, já que o ensaio foi realizado somente com intuito de se verificar a possibilidade de melhora na eficiência de degradação de matéria orgânica no reator.

As Tabelas 5.4.3. e 5.4.4. indicam não ter ocorrido diferença significativa nas populações microbianas presentes nas duas primeiras condições operacionais desse experimento. A população presente no 65º dia de operação era a mesma aparentemente e encontrava-se distribuída praticamente da mesma forma que a população presente no 28º dia de operação. Caso tenha ocorrido alguma mudança, essa não foi significativamente efetiva para ser notada apenas com análises de microscopia óptica ou de varredura. Em ambos os casos, as morfologias associadas ao processo metanogênico hidrogenotrófico (bacilos fluorescentes) encontram-se mais presentes no início do reator, diminuem a frequência a partir do quarto ponto de amostragem e, finalmente, tornam-se ausentes no oitavo ponto de amostragem. As morfologias associadas ao processo metanogênico acetoclástico encontram-se distribuídas de maneira praticamente uniforme ao longo de todo o reator. As morfologias associadas ao processo hidrolítico fermentativo, bacilos e cocos não fluorescentes, filamentos e bacilos curvos, predominam também no início do reator, provavelmente atuando na degradação de aminoácidos. Um fato interessante a ser ressaltado diz respeito à presença dos protozoários no início do reator que operou 65 dias (primeira condição operacional). Biagini *et al.* (1988) encontraram uma espécie de protozoários capaz de viver em condições microaeróbias, anóxicas e anaeróbias. Neste trabalho, não se promoveu a retirada do oxigênio presente naturalmente na água de preparo do efluente. Portanto, pode-se inferir que o O₂ estivesse presente no início do processo em quantidades muito baixas e propiciasse o aparecimento de organismos como *Hexamita sp.*, um protozoário amitocondriado, livre-natante, com capacidade de fermentar carboidratos e aminoácidos. Dados do trabalho sugerem que células de *Hexamita sp.* realizam o passo metabólico arginina desidrolase, que gera energia a partir do catabolismo da arginina, formando citrulina, ornitina, íons amônio e dióxido de carbono. Os autores acrescentam que as células de *Hexamita sp.* são capazes de viver na ausência de carboidratos, todavia com baixas taxas de crescimento, como foi observado no presente trabalho, já que esses organismos mostraram-se

presentes em pequeno número. Através das análises de microscopia de fluorescência, foi possível observar bacilos fluorescentes no interior dos protozoários, como se encontra ilustrado nas fotos a e b da Figura 5.4.8. As outras fotos da figura mostram as morfologias mais presentes ao longo do reator; a foto c, uma visão geral de várias das morfologias encontradas no ensaio; a foto d dá destaque aos bacilos curvos que foram predominantes no início do reator; as fotos e e f referem-se ao mesmo campo, obtidas sob contraste de fase e fluorescência e mostram cocos fluorescentes.

Na Figura 5.4.9., estão ilustrados os microrganismos mais importantes da segunda condição operacional. Na foto, são observados filamentos 1 e 3, predominantes no segundo ponto de amostragem, dois tipos de bacilos curvos também predominantes no segundo ponto de amostragem, cocos em par e alguns bacilos não fluorescentes. Na foto 2, tem-se, além das morfologias citadas na foto 1, morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*, cocobacilos, bacilos 3, além de um tipo de bacilo semelhante ao bacilo 3, todavia com extremidades escuras. Na foto d, têm-se esses bacilos em detalhe formando cadeias. Na foto c, tem-se uma foto com os bacilos fluorescentes 1, e na foto e, bacilos fluorescentes 2 com cocos fluorescentes. Na foto f, tem-se em detalhe uma morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*

Tabela 5.4.3.: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína. (DQO = 400 mg.*l*⁻¹) como única fonte de carbono, período de adaptação igual a 68 dias, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha sp</i>	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++
<i>Methanosarcina sp.</i>		+						+	+
B. Fluorescente 1	++++	++++	++++	+++	+++	++	++		
B. Fluorescente 2	+	++	+	+		+	+		++
C. Fluorescente		+	+	+	+			+	++
F. Fluorescente		+			+		+		
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	++	++			++	++		++
Bacilo curvo 2	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Filamento 1	++	++		++	++		+++		
Filamento 2	+++	++	++	++			++	++	++
Filamento 3	++	++++	++	++		++	++	++	++
Bacilo 1	++++	+++				++			
Bacilo 2	++++	+++							
Bacilo 3	+++	++	++						++
Bacilo 4			++	++	++	++	+++	++	++
Bacilo 5	++							++	++
Espiroqueta 1	+++	+++		++	++				++
Espiroqueta 2	++								
Cocobacilo	++	++		++	++	+++	++	++	++++
Cocos 1			++			+++	+++	++	+++
Cocos 2	+++	+++		++	++	+++	+++	++	+++
Protozoário	+	++	+						

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.4.8 : Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com caseína ($\text{DQO} = 400 \text{ mg.l}^{-1}$) como única fonte de carbono e período de adaptação igual a 68 dias. a: → protozoário; b: → bacilos fluorescentes no interior do protozoário; c: → bacilo curvo I; e: coco que fluoresce na foto f.

Tabela 5.4.4: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína. (DQO= 400 mg.l⁻¹) como única fonte de carbono, período de adaptação 28 dias, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha</i> sp	+++	+++	++	++++	+++	++	++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.		+						+	+
B. Fluorescente 1	++++	++++	++++	++++	+++	++	++		
B. Fluorescente 2	++	+++	++	++		++	++		+++
C. Fluorescente		++	++	++	++			++	+++
F. Fluorescente		+			+		+		
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	++	++	++		++	++		++
Bacilo curvo 2	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
Filamento 1	++	++++		++	++		+++		
Filamento 2	+++	++	++	++			++	++	++
Filamento 3	++	++++	++	++		++	++	++	++
Bacilo 1	++++	+++				++			
Bacilo 2	++++	+++							
Bacilo 3	+++	++	++	++					+++
Bacilo 4			++	++	++	++	+++	++	++
Bacilo 5	++							++	++
Espiroqueta 1	++	+++		++	++				++
Espiroqueta 2	++								
Cocobacilo	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	+++
Cocos 1			++			+++	+++	++	+++
Cocos 2	+++	+++		++	++	+++	+++	++	+++

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.4.9: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com caseína (DQO = 400 mg. l^{-1}) como única fonte de carbono e período de adaptação igual a 28 dias. Foto a: filamento 1, bacilo curvo 1 e 2, espiroqueta e diplococos; b: morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.* e bacilos com extremidades pontuadas; c: bacilos fluorescentes 2; d: bacilos com extremidades pontuadas, e, cocos fluorescentes e bacilos 2; e f: morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*

Após a adição de carboidratos, pode-se notar que as morfologias associadas à metanogênese se distribuíram mais uniformemente ao longo do reator e se mostraram predominantes em vários pontos. O aumento na frequência de aparição das morfologias

associadas ao processo metanogênico acetoclástico (Figura 5.4.10 - a e f) pode estar relacionado com o aumento da concentração acumulada de acetato no meio líquido, conforme pode ser observado quando se comparam as Figuras 5.4.1., 5.4.2. e 5.4.3.. Todavia, é provável que, devido ao alto tempo de geração das arqueas acetoclásticas, dez dias de operação não tenham sido suficientes para que o crescimento de tais microrganismos pudesse causar a manutenção do valor da constante k_2^{app} . O aumento da concentração de acetato acumulada foi, provavelmente, devido a um favorecimento do processo acidogênico, confirmado pelo aumento de k_5^{app} , em virtude da adição de outra fonte de carbono facilmente degradável. O favorecimento do processo acidogênico aumentou possivelmente a oferta de H_2 e CO_2 no meio e, com isso, houve também um aumento na frequência de aparição das morfologias relacionadas ao processo metanogênico hidrogenotrófico (Figura 5.4.10 - e). A presença de tais microrganismos, a partir da retirada de H_2 do meio líquido, propiciou o processo acetogênico com o ácido propiônico como precursor, mantendo o valor de k_4^{app} constante. Os bacilos associados à hidrólise protéica e fermentação dos aminoácidos mostraram-se fortemente presentes até o sétimo ponto do reator, mas em nenhum ponto se mostraram predominantes. As morfologias predominantes relacionadas aos processos acidogênico foram os bacilos curvos (Figura 5.4.10 – a) no início do reator (ponto 2), os cocobacilos (Figura 5.4.10 b) nos três primeiros pontos e também no oitavo ponto, onde também observou-se o predomínio de cocos (Figura 5.4.10 – d). O aumento da frequência de aparição de bacilos curvos no início dos reatores, após a adição de carboidratos, já havia sido notada na presença de outras proteínas e, segundo Lens *et al.* (1998), provavelmente se dá devido ao aumento da relação entre a concentração de acetato e glicose.

Após a adição de lipídios, observa-se que ocorre a diminuição das morfologias associadas ao processo metanogênico e o aumento de bacilos não fluorescentes, em especial dos bacilos dois e três, predominantes ao longo de todo o reator. Os cocobacilos continuaram fortemente presentes em todo o reator, tendo sido predominantes nos pontos 1, 4, 5 e 8. Os cocos também mantiveram sua frequência de aparição, sendo que os filamentos aumentaram sua frequência no início do reator. Esse foi um fato interessante observado no presente trabalho. Na maioria dos casos, quando ocorreu a diminuição na frequência de aparição dos microrganismos metanogênicos, observou-se o aparecimento ou o aumento da frequência de aparição de filamentos. Em relação à grande diminuição da frequência de aparição dos microrganismos metanogênicos, pode-se dizer que tal fato condiz com todos os experimentos realizados no presente trabalho de pesquisa utilizando lipídios como co-substrato das proteínas na alimentação dos reatores. Parece realmente que tais moléculas causam efeito negativo sobre os

microrganismos metanogênicos, principalmente os acetoclásticos. É importante citar que é possível que o tempo de dez dias utilizado nos experimentos não tenha sido suficiente para a adaptação dos microrganismos a tal efeito negativo. Todavia, vários autores como Perle *et al.* (1995) e Petrury & Lettinga (1997) relataram tal efeito em seus trabalhos de pesquisa.

Os cocos presentes nas condições operacionais em que a caseína foi utilizada como fonte proteínicas são os mesmos observados nas amostras provenientes dos reatores alimentados com efluentes sintéticos contendo S.A.B. e peptona. Tais microrganismos foram muito mais expressivos nos reatores alimentados com caseína e S.A.B. do que nos reatores alimentados com peptona, tendo muitas vezes se apresentado em cadeia. Wallace & Brammall (1985) indicam *Streptococcus bovis* como uma das mais importantes espécies relacionadas à degradação de proteínas no rúmen e salientam que tais microrganismos são aptos ao crescimento em meio contendo caseína por possuírem elevada atividade de leucina peptidase. Observando-se o conteúdo dos aminoácidos nas proteínas estudadas, pode-se notar que tanto a caseína como a S.A.B. têm cerca 10 % de sua constituição composta por resíduos de leucina, enquanto que a peptona apresenta cerca de 4%, o que explicaria o fato de os cocos serem observados com mais freqüência na presença de caseína e S.A.B. A formação de cadeia foi relatada por Madigan *et al.* (1997) como um dos atributos dessa espécie, que mostrou tal formação tanto na presença de caseína como na presença de S.A.B. É importante salientar a inferência sobre a espécie *Streptococcus bovis* foi devido às características encontradas nos trabalhos de Madigan *et al.* (1997) e Wallace & Brammall. (1985). Todavia, sabe-se que os cocos encontrados nesse trabalho podem pertencer a várias linhagens, podendo ser provenientes também das famílias *Peptococcus sp.* ou *Staphylococcus sp.*, indicadas por Siebert & Torien (1968) como dois dos maiores grupos de bactéria proteolíticas encontradas em lodo anaeróbio proveniente de tratamento de esgotos sanitários. A formação de “cachos de uva”, indicada por Madigan *et al.* (1997) como característica de culturas de *Staphylococcus sp.*, só foi verificada nesse trabalho na condição operacional onde o efluente sintético a base de caseína, carboidratos e lipídeos e encontra-se ilustrado na foto b da Figura 5.4.10. A estrutura de diplococos, indicada por McInnerney (1988) como característica de culturas de *Peptococcus sp.*, no entanto, pôde ser visualizada em muitas das amostras analisadas no presente trabalho de pesquisa e encontra-se ilustrada na foto d da Figura 5.4.10..

Tabela 5.4.5: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína e carboidratos como fonte de carbono e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha</i> sp	++	++++	++++	+++	++++	+++	++++	+++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. Fluorescente 1	++	++	+	-	-	++	-	-	-
B. Fluorescente 2	++++	++	+++	+++	+++	++++	+++	++	++
C. Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	+++	++++	-	-	-	-	+	-	-
Bacilo curvo 2	-	++++	-	-	-	-	++	-	-
Filamento 1	++	-	-	-	-	-	+++	++	-
Filamento 2	-	-	-	++	++	++	-	++	-
Filamento 3	+++	-	-	-	-	-	-	+++	-
Bacilo 1	+	++	++	+	+	-	++	-	-
Bacilo 2	+++	++	++	+	+	++	++	-	-
Bacilo 3	-	++	+	+++	+++	+++	+++	-	-
Bacilo 4	++	+++	+++	-	-	+	++	+	+
Bacilo 5	-	+	+	++	++	++	++	+	+
Espiroqueta 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espiroqueta 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocobacilo	++++	++++	++++	+++	+++	+	+++	++++	++
Cocos 1	++	+	++	-	-	-	-	-	-
Cocos 2	+++	+	++	++	++	++*	+++	++++	++
Protozoário	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Figura 5.4.10 : Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína e carboidratos como fonte de carbono. a: bacilos curvos e morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.*; b: cocobacilos; c: bacilo 4; d: diplococos; e: bacilos fluorescentes e f: vários bacilos e morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.*

Tabela 5.4.6: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono, e submetidas à microscopia de contraste de fase e fluorescência .

	Pontos de amostragem								
Domínio <i>Archaea</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Methanosaetha</i> sp	+++	-	+++	++	+	++++	++++	++	+++
<i>Methanosarcina</i> sp.	+	+	++	+	++	++	+	+	+
B. Fluorescente 1	++	+++	-	-	-	-	-	-	-
B. Fluorescente 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C. Fluorescente	++	-	-	-	-	-	-	-	-
F. Fluorescente	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Domínio <i>Bacteria</i>									
Bacilo curvo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacilo curvo 2	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Filamento 1	+++	+++	+	+	+	+	+	-	-
Filamento 2	+++	+	+	+	+	+	-	-	-
Filamento 3	+	++	+	+	+	-	-	-	-
Bacilo 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacilo 2	++++	++++	+	++++	+++	++++	+++	+++	++++
Bacilo 3	++++	++++	++	++++	+++	++++	+++	+++	++++
Bacilo 4	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Bacilo 5	++	-	-	+	+	-	-	-	+
Espiroqueta 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espiroqueta 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cocobacilo	++++	+++	+++	++++	++++	+++	+++	++++	++
Cocos 1	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Cocos 2	++	+++	-	-	-	-	-	-	-
Protozoário	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes freqüentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

Tabela 5.4.11.: Morfologias presentes nas amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com efluente sintético contendo caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono. a: bacilos 3 e coccobacilos; b: cocos não fluorescentes; c e d: bacilos sob contraste de fase e fluorescência; e: cocos, coccobacilos, bacilos 3; e f: filamentos e bacilos curvos.

5.5. Comparação entre os efluentes sintéticos utilizados nos ensaios utilizando RAHLFs

No presente trabalho de pesquisa, foram realizados quatro ensaios utilizando efluentes sintéticos, que doravante serão denominados Ensaio_{S.A.B.} (reator alimentado com efluente sintético contendo S.A.B. como fonte de proteínas), Ensaio_{PEP1} (reator alimentado com efluente sintético à base de peptona com concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), Ensaio_{PEP2} (reator alimentado com efluente sintético à base de peptona com concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), Ensaio_{CAS} (reator alimentado com efluente sintético contendo caseína como fonte de proteínas). Em cada ensaio, foram testadas de 4 a 5 condições operacionais, que serão denominadas: Condição 1 (somente proteínas como fonte de carbono com DQO igual a $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ e tempo de adaptação igual a 28 dias), Condição 2 (proteínas e carboidratos como fonte de carbono e tempo de adaptação igual a 10 dias), Condição 3 (proteínas, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono e tempo de adaptação igual a 10 dias), Condição 4 (somente proteínas como fonte de carbono com DQO igual a $600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ e no caso da caseína, somente proteínas como fonte de carbono com DQO igual a $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, com suplemento de ferro, em todos os casos, com tempo de adaptação igual a 10 dias) e Condição 5 (somente caseína como fonte de carbono com DQO igual a $400 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ e tempo de adaptação igual a 65 dias).

Na Tabela 5.5.1. encontram-se listadas todas as constantes cinéticas encontradas a partir do ajuste cinético de reações em série e paralelo de primeira ordem.

Inicialmente, realizou-se a comparação entre as condições operacionais nas quais a proteína ou o hidrolisado protéico estiveram presentes como única fonte de carbono. Em relação à constante de degradação de proteínas e formação de ácido acético (k_1^{app}), pôde-se notar que o maior valor foi encontrado para o consumo de peptona, seguido do valor obtido para a caseína e, finalmente, para a S.A.B., quando a concentração afluyente de bicarbonato de sódio foi igual a $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Tal fato pode ter ocorrido devido à peptona ser produto da hidrólise enzimática controlada de proteínas provenientes de tecidos animais, o que, provavelmente, facilitou seu processo de degradação, já que a hidrólise protéica é tida como etapa limitante da degradação das proteínas (McInnerney, 1988). O mesmo comportamento pode ser observado para os valores das constantes de degradação de proteína e formação de ácido propiônico (k_3^{app}). A constante global de primeira ordem de degradação de proteínas ($k_1^{\text{app}} + k_3^{\text{app}}$) também se mostrou maior em Ensaio_{PEP1}, seguida de Ensaio_{CAS}, seguida de Ensaio_{S.A.B.} e, considerando-se que foram utilizadas concentrações iniciais semelhantes de proteínas, concluiu-se que as velocidades iniciais de degradação das diferentes proteínas seguem a mesma tendência. Após a diminuição da

concentração afluyente de bicarbonato de sódio no meio à base de peptona, pôde-se observar um cenário diferente. As constantes de degradação de derivados protéicos e as concentrações dos ácidos acético e propiônico diminuíram, fazendo com que a velocidade de degradação da peptona também diminuísse. Observou-se que a maior velocidade inicial de degradação de proteínas ou derivados protéicos passou a ser a de Ensaio_{CAS}, seguida do valor de Ensaio_{PEP2} e Ensaio_{S.A.B.}. A constante de conversão de ácido propiônico a acético (k_4^{app}) seguiu tendência inversa à das constantes globais de degradação de proteínas, o que levou a concluir que a rápida decomposição de derivados protéicos facilmente degradáveis foi responsável pela instabilidade verificada na fase metanogênica do processo anaeróbio. O processo de degradação da peptona tornou-se mais estável após a diminuição da concentração afluyente de bicarbonato de sódio, passando a caseína a apresentar a maior velocidade de degradação de proteína e, como consequência, este processo tornou-se o menos estável. Todavia, analisando-se a quinta condição operacional desse mesmo ensaio, observa-se que, nesta condição, obteve-se o maior valor de k_4^{app} de todos os ensaios efetuados. Ou seja, de processo menos estável, a degradação de efluente sintético contendo caseína como única fonte de carbono passou a ser o mais estável, após o aumento do tempo de adaptação da biomassa. Tal fato corrobora os resultados obtidos por Perle *et al.* (1995) no tratamento de efluente sintético que simulava água residuária de laticínios, que continha teores elevados de caseína. Os autores concluíram que a adoção de tempo de adaptação adequado é fundamental para se obter melhor desempenho de reatores anaeróbios para o tipo de água residuária estudada.

Em relação ao consumo de ácido acético, puderam ser observados valores da mesma ordem de grandeza para a constante k_2^{app} em todas as primeiras condições operacionais, com exceção de Ensaio_{PEP1}, cuja constante foi significativamente menor (61%) que a média dos outros três, indicando, mais uma vez, que o elevado teor de bicarbonato de sódio foi prejudicial à metanogênese nesse ensaio. No Ensaio_{CAS}, realizado após a adoção de período de adaptação maior, o processo de degradação da caseína apresentou maiores valores de k_2^{app} (aumento de 28%). Esse resultado está de acordo com o fato de o mais baixo teor residual de ácidos voláteis ter sido encontrado no efluente do reator nessa condição operacional. Esta foi a condição na qual as concentrações de produtos intermediários foram as menores, ou seja, na qual houve o menor acúmulo desses compostos. Após a adição de carboidratos, os valores de k_2^{app} permaneceram constantes no Ensaio_{PEP1}, diminuíram 43% no Ensaio_{PEP2}, aumentaram 44% no Ensaio_{S.A.B.} e diminuíram 60% no Ensaio_{CAS}. Todavia, o valor dessa constante decresceu após a adição de lipídeos, em todos os ensaios realizados.

De forma geral, o modelo cinético proposto indica que, na degradação da peptona, a etapa limitante do processo foi a conversão dos ácidos intermediários, enquanto que nos processos de degradação da caseína e da SAB, a etapa limitante foi a hidrólise da proteína.

Nas primeiras condições operacionais do Ensaio_{PEP1} e do Ensaio_{CAS}, os principais compostos precursores do ácido acético foram os derivados protéicos. Após a diminuição da concentração afluyente de bicarbonato de sódio no efluente à base de peptona (primeira condição experimental de Ensaio_{PEP2}) e após um maior tempo de adaptação do reator alimentado com efluente a base de caseína (quinta condição operacional de Ensaio_{CAS}), o principal precursor de ácido acético foi o propionato. Ou seja, à medida que os processos tornaram-se mais estáveis, o propionato tornou-se o principal precursor do ácido acético, assim como foi verificado no processo de degradação de S.A.B.. De maneira geral, comparando-se os valores de k_1^{app} e k_3^{app} conclui-se que, quando as proteínas são a única fonte de carbono presente no meio, os processos de degradação anaeróbia de proteínas ou derivados protéicos produzem mais acetato do que propionato. Tal resultado está em concordância com um estudo teórico realizado em relação à composição de aminoácidos das proteínas (Entrez Protein – www.ncbi.gov e www.organotechnie.com), baseado nas reações apresentadas por McInnerney (1988) e Barker (1981). Segundo esse estudo, o processo anaeróbio de fermentação dos aminoácidos presentes em 100 gramas de proteínas resulta em até 38,4 gramas de acetato, 22,1 gramas de propionato e 31,0 gramas de butirato para S.A.B.; em até 28,9 gramas de acetato, 16 gramas de propionato e 12,54 gramas de butirato para a caseína; enquanto que, para a peptona, resulta em até 36,4 gramas de acetato, 16 gramas de propionato e 17,7 gramas de butirato.

Após a adição de carboidratos aos efluentes, a situação se modificou ligeiramente no Ensaio_{PEP2}, tendo o processo de degradação de peptona passado a gerar maior concentração de propionato. Os principais precursores do acetato tornam-se os carboidratos em todos os ensaios, com exceção do Ensaio_{S.A.B.}, após a adição de carboidratos. Ensaio_{S.A.B.} foi o único que apresentou aumento na estabilidade do reator com adição de carboidratos, já que o valor de k_4^{app} baixou nas segundas condições operacionais em relação às primeiras nos Ensaio_{PEP1} e Ensaio_{PEP2} e manteve-se constante em Ensaio_{CAS}. Em todos os ensaios, observou-se aumento no valor da constante k_3^{app} após a adição de lipídeos, sendo que, no Ensaio_{S.A.B.}, a produção de ácido propiônico a partir da degradação da proteína se igualou à produção de ácido acético. Infere-se, portanto, que a produção de propionato via degradação de proteínas foi favorecida após a adição de lipídeos. Os principais precursores de acetato continuaram sendo os carboidratos em todos os ensaios, com exceção do Ensaio_{S.A.B.}, no qual o maior precursor da formação de acetato

continuou sendo o propionato, indicando, mais uma vez, sua supremacia em relação à estabilidade de processo. O ensaio menos estável (Ensaio_{PEP1}) mostrou maiores problemas que os outros após a adição de lipídeos, pois, além da mudança na rota metabólica da degradação da peptona, que favoreceu a formação de propionato, o valor da constante k_6^{app} também aumentou em relação à condição anterior, indicando que a degradação de carboidratos também passou a produzir mais propionato.

Tabela 5.5.1.: Constantes observadas do modelo cinético de reações em série e paralelo de primeira ordem em todos os ensaios realizados

Fonte de carbono	$k^{app}_1 (h^{-1})$	$k^{app}_2 (h^{-1})$	$k^{app}_3 (h^{-1})$	$k^{app}_4 (h^{-1})$	$k^{app}_5 (h^{-1})$	$k^{app}_6 (h^{-1})$
Peptona (DQO = 400 mg. l^{-1} e 1 g. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,39	0,38	0,24	0,25		
Peptona + carboidratos (1 g. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,24	0,38	$1,5 \cdot 10^{-3}$	0,13	0,35	0,22
Peptona + carboidratos e lipídeos (1 g. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,04	0,05	0,21	0,14	1,08	0,51
Peptona (DQO = 600 mg. l^{-1} e 1 g. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu	Não convergiu
Peptona (DQO = 400 e 600 mg. l^{-1} e 400 mg. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,19	1,08	0,12	0,70		
Peptona + carboidratos (400 mg. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,14	0,61	0,16	0,32	0,87	-
Peptona + carboidratos e lipídeos (400 mg. l^{-1} de bicarbonato de sódio)	0,03	0,28	0,17	0,34	0,88	-
Soro albumina bovina (DQO 400 e 600 mg. l^{-1})	0,16	0,92	0,02	0,43		
Soro albumina bovina + carboidratos	0,17	1,33	$4,1 \cdot 10^{-5}$	1,19	-	0,28
Soro albumina bovina + carboidratos e lipídeos	0,05	0,84	0,05	0,67	0,23	0,01
Caseína (DQO = 400 mg. l^{-1}) 65 dias	0,40	1,32	0,07	0,90		
Caseína (DQO = 400 mg. l^{-1}) 28 dias	0,38	0,94	0,10	0,25		
Caseína + carboidratos	0,17	0,38	0,09	0,26	0,41	0,04
Caseína + carboidratos e lipídeos	0,06	0,17	0,13	0,25	0,98	0
Caseína (DQO = 400 g. l^{-1} e 10 mg. l^{-1} de ferro)	0,21	0,20	0,24	0,54	--	--

Houve desbalanceamento crescente relacionado ao aumento da carga orgânica somente no Ensaio_{PEP1}. Nos outros ensaios onde essa condição foi testada, foi possível o ajuste do modelo com as mesmas constantes, tanto para DQO de 400 mg.*l*⁻¹, quanto para DQO de 600 mg.*l*⁻¹.

Tabela 5.5.2.: Velocidades iniciais de degradação de proteínas ou derivados de sua hidrólise em todos os ensaios realizados

Fonte de Carbono	Velocidades iniciais de degradação de proteínas ou derivados de sua hidrólise (mg S.A.B. <i>l</i> ⁻¹ .h ⁻¹)
Peptona (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹ e 1g. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	215,5
Peptona + carboidratos (1g. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	82,6
Peptona + carboidratos + lipídeos (1g. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	86,2
Peptona (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹ e 400 mg. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	99,2
Peptona + carboidratos (400 mg. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	102,6
Peptona + carboidratos + lipídeos (400 mg. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	82,8
Peptona (DQO = 600 mg. <i>l</i> ⁻¹ e 400 mg. <i>l</i> ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	150,0
BSA (DQO = 400 mg <i>l</i> ⁻¹)	60,9
BSA + carboidratos	59,5
BSA + carboidratos + lipídeos	35,0
BSA (DQO = 600mg. <i>l</i> ⁻¹)	91,4
Caseína (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) 65 dias	145,7
Caseína (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) 28 dias	148,8
Caseína + carboidratos	79,7
Caseína + carboidratos + lipídeos	58,9
Caseína (DQO = 400 mg. <i>l</i> ⁻¹) + 10 mg. <i>l</i> ⁻¹ d e ferro	139,5

Os dados da Tabela 5.5.2. permitem constatar que, nos ensaios mais estáveis (Ensaio_{S.A.B.} e Ensaio_{PEP2}), houve a manutenção do valor da velocidade inicial da degradação de derivados protéicos após a adição de carboidratos ao efluente sintético.

Nos outros dois ensaios, houve decréscimo no valor da velocidade inicial de degradação de proteínas após a adição de tais moléculas. É importante citar que os processos de degradação das proteínas ou derivados protéicos cujas velocidades iniciais de degradação foram maiores se mostraram mais instáveis.

A presença de lipídeos no afluente se constituiu no maior problema para o processo estudado. Em todos os ensaios realizados, observou-se a diminuição do valor da velocidade inicial de degradação de proteínas ou derivados de sua hidrólise. Esse fato isoladamente não seria suficiente para condenar a presença de lipídeos como problema ao processo de degradação anaeróbia de proteínas ou derivados de sua hidrólise. Todavia, observou-se também a diminuição na eficiência de remoção das proteínas ou derivados de sua hidrólise, bem como o aumento no teor residual de ácidos voláteis, diminuindo, dessa forma, de maneira drástica, a eficiência na remoção de DQO.

Na Tabela 5.5.3 constata-se que a eficiência de remoção de proteínas ou derivados de sua hidrólise variou de 87% a 99% em todas as condições operacionais nas quais essas substâncias eram a única fonte de carbono. Somente em dois dos ensaios realizados, Ensaio_{PEP2} e Ensaio_{CAS}, é que houve diminuição na eficiência de remoção de tal composto, após a adição de carboidratos, tendo essa redução sido de 6 e 7 pontos percentuais, respectivamente. No Ensaio_{PEP1}, a eficiência de remoção de derivados protéicos manteve-se constante e, no Ensaio_{S,A,B}, esse valor aumentou cerca de 3 pontos percentuais. Após a adição de lipídeos, a remoção de proteínas decresceu em aproximadamente 74%. Os maiores teores de ácidos ocorreram, também, nas condições operacionais nas quais os lipídeos estavam presentes na alimentação, contrariando Vidal *et al.* (2000), que observaram prevenção do acúmulo de ácidos quando o processo de degradação de proteínas ocorreu concomitantemente ao processo de degradação de lipídios. É provável que, como indicado por Sayed *et al.* (1988), a remoção de óleos e gorduras seja muito importante para o sucesso do processo de degradação anaeróbia de águas residuárias com elevado teor protéico, como as provenientes de abatedouros. Como apresentado no presente trabalho de pesquisa, isso se aplicou tanto no que diz respeito à eficiência de degradação de moléculas de proteínas, e seus derivados, quanto na eficiência de degradação de matéria orgânica global.

De maneira geral, acredita-se que, como já afirmado por Martins *et al.* (1991), as moléculas de proteínas são muito complexas e, por esse motivo, estão sujeitas a processos distintos de degradação. Para o dimensionamento otimizado de reatores anaeróbios no tratamento de águas residuárias cuja composição contemple elevadas frações protéicas (mais de

50%), sugere-se que sejam efetuados ensaios preliminares para a possível prevenção de desbalanceamentos ou a diminuição de frações residuais nos efluentes dos reatores. Todavia, os resultados encontrados nesse trabalho, com reatores em escala de bancada com regime hidrodinâmico semelhante ao pistonado, não justificam a separação de proteínas e carboidratos, nem para a otimização da degradação de matéria orgânica, nem para a otimização da degradação de proteínas como o sugerido por Martins *et al.* (1991) e Breure *et al.* (1986).

Tabela 5.5.3.: Valores residuais de matéria orgânica, ácido acético e propiônico e eficiência de remoção de proteínas e seus derivados nos efluentes dos RAHLFs utilizados.

Fonte de Carbono	Residuais (mg . l ⁻¹)			Eficiência de remoção (%)
	DQO	Ácido acético	Ácido propiônico	
Peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹ e 1g.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	96	20,8	19,7	94
Peptona + Carboidratos (1g.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	155	46,3	22,0	94
Peptona + Carboidratos + Lipídeos (1g.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	309	132	58,9	72
Peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹ e 1g.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	351	201,5	61,0	89
Peptona (DQO = 400 mg.l ⁻¹ e 400 mg.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	37	9,3	5,3	94
Peptona + carboidratos (400 mg.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	123	34,2	21,2	88
Peptona + carboidratos + lipídeos (400 mg.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	219	76,2	24,9	79
Peptona (DQO = 600 mg.l ⁻¹ e 400 mg.l ⁻¹ de bicarbonato de sódio)	141	48,0	12,0	89
BSA (DQO = 400 mg.l ⁻¹)	37	4,4	3,4	87
BSA + carboidratos	37	14,1	5,56	90
BSA + carboidratos + lipídeos	143	23,0	9,7	70
BSA (DQO = 600 mg.l ⁻¹)	105	21,6	6,4	79
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 28 dias	110	12,1	8,1	99
Caseína + carboidratos	147	33,0	15,8	92
Caseína + carboidratos + lipídeos	361	118,7	40,3	75
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) + 10 mg.l ⁻¹ de ferro	52	72,3	8,2	98
Caseína (DQO = 400 mg.l ⁻¹) 65 dias	14	4,8	0,5	99

5.6. Resultados dos Ensaio Utilizando Água Residuária Proveniente de Abatedouro de Aves

5.6.1. Determinação dos Parâmetros Cinéticos Aparentes.

Os resultados encontrados no ensaio comparativo realizado utilizando dois reatores (UASB e RAHLF) para o tratamento do efluente proveniente de abatedouro de aves serão apresentados nesse item. Surpreendentemente, não foram detectados ácidos voláteis nas amostras coletadas ao longo dos dois reatores, após o primeiro ponto de coleta. Esse resultado permitiu supor que a etapa limitante do processo foi a solubilização da matéria orgânica particulada presente na água residuária. O regime de escoamento no RAHLF foi considerado como semelhante ao pistonado devido à evidências constatadas por De Nardi *et al.* (1998). No reator do tipo UASB também foi realizada a mesma consideração devido à elevada relação entre seu diâmetro equivalente e seu comprimento, além do fato da velocidade ascensional do líquido não ter sido suficiente para a expansão da manta de lodo. Aos resultados das análises de concentração de matéria orgânica ao longo do comprimento do reator, ajustou-se o modelo cinético de primeira ordem, com ou sem concentração residual de substrato, dependendo do caso estudado, como também o fizeram Rodríguez-Martínez *et al.* (2002). Os valores de concentração de substrato medidos e previstos pelo modelo encontram-se ilustrados nas Figuras 5.6.1. à 5.6.8.

Figura 5.6.1. – Perfil de DQO solúvel ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem com residual ($R^2 = 0,98651$).

Figura 5.6.2. – Perfil de DQO bruta ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem, com residual ($R^2 = 0,99323$).

Figura 5.6.3. – Perfil de DQO particulada ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem, com residual ($R^2 = 0,98925$).

Figura 5.6.4. – Perfil da concentração de proteínas ao longo do RAHLF alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem ($R^2 = 0,92286$).

Figura 5.6.5. – Perfil de DQO solúvel e ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente.

Figura 5.6.6. – Perfil de DQO total ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem, com residual ($R^2 = 0,99037$).

Figura 5.6.7. – Perfil de DQO particulada ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem, com residual ($R^2 = 0,98925$).

Figura 5.6.8. – Perfil da concentração de proteínas ao longo do UASB alimentado com efluente de um abatedouro de aves: (■) valores obtidos experimentalmente e (—) valores previstos pelo modelo de decaimento exponencial de primeira ordem ($R^2 = 0,98943$).

Pode-se observar nas figuras apresentadas que, na maioria dos casos, o modelo de decaimento exponencial de primeira ordem apresentou bom ajuste aos dados experimentais. Nota-se que não há residual significativo quando os dados se referem a proteínas, enquanto que esse residual aparece quando as várias frações de matéria orgânica efluente estão expressas como DQO. No caso do perfil de DQO solúvel ao longo do UASB, não foi possível realizar o ajuste do modelo de decaimento exponencial de primeira ordem, pois não houve remoção de significativa de DQO solúvel além do primeiro ponto de amostragem.

Os valores residuais encontrados para as várias frações de matéria orgânica nos efluentes dos reatores utilizados se encontram listados na Tabela 5.6.1. Pode-se observar que as maiores porcentagens de remoção foram relativas à DQO particulada, tanto no efluente do reator UASB, como no efluente do RAHLF. Para essa fração, o Reator UASB mostrou melhor eficiência que o RAHLF. Em relação à fração solúvel, no entanto, pode-se observar que o RAHLF apresentou melhores eficiências de remoção, com menor teor residual, apesar de todo o decréscimo dessa fração ter ocorrido até o primeiro ponto de amostragem no reator UASB. Nota-se que, em ambos os casos, os maiores teores residuais encontrados referem-se à DQO solúvel. É importante enfatizar que, neste trabalho, essa fração engloba, também, a fração coloidal, indicada por Petrury & Lettinga (1997) como recalcitrante em processos anaeróbios de tratamento de águas

residuárias. No caso do RAHLF, cerca de 11% desse residual era composto por proteínas, enquanto que, no reator UASB, essa fração foi de 10%.

Nas Figuras 5.6.9. e 5.6.10, pode-se visualizar o gel de eletroforese resultado do experimento SDS-PAGE, que objetivou o acompanhamento da degradação de proteínas ao longo dos reatores utilizados. Em ambos os casos, nota-se a presença de uma banda até o final do processo, cujo peso molecular se assemelha ao da S.A.B.. Realmente, a maior parte das proteínas presentes na água residuária utilizada tem origem no sangue das aves, o que justifica a presença de proteínas com peso molecular semelhante às proteínas encontradas no sangue de bovinos. Com isso, considerou-se o residual protéico como S.A.B. e a partir de uma curva de correlação entre concentrações de S.A.B. e DQO, obteve-se a fração de DQO relativa à presença de proteínas. O teor de proteínas não foi mensurado na fração particulada, pois não seria possível distinguir entre a proteína correspondente ao afluente daquela proveniente da biomassa microbiana, resultante da manipulação da amostra durante a amostragem. Nas amostras coletadas, mensurou-se o teor de carboidratos e observou-se que toda a concentração de tal composto foi consumida no início dos reatores. Além disso, não foram detectados ácidos voláteis em nenhuma das amostras analisadas por cromatografia gasosa. Acredita-se, portanto, que aproximadamente 90% do residual solúvel que não era constituído por proteínas, encontrado em ambos os reatores, era composto por lipídeos, seus produtos hidrolisados, ou outros compostos, como produtos microbianos solúveis (PMS). Aquino & Stuckey (2002) estudaram a produção de PMS em reatores anaeróbios, e concluíram que a maior parte da DQO efluente de reatores anaeróbios de mistura de bancada, submetidos a alguma condição de “stress”, era composta por (PMS), sendo que a carência de nutrientes fez com que a produção de tais compostos quadruplicasse. É possível que tenha ocorrido deficiência de nutrientes nos reatores utilizados, já que grande parte da matéria orgânica foi consumida no início dos processos, com a utilização de nutrientes naturalmente presentes na água residuária utilizada como substrato.

Figura 5.6.9.: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do RAHLF alimentado com água residuária de abatedouro de aves

Figura 5.6.10.: Gel de poliacrilamida para determinação de peso molecular de proteínas – amostras retiradas ao longo do reator UASB alimentado com água residuária de abatedouro de aves

Tabela 5.6.1.: Percentuais de remoção e valores residuais de matéria orgânica nos processos de tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves nos dois reatores utilizados.

	RAHLF		UASB	
	Residual (mg.l ⁻¹)	% remoção	Residual (mg.l ⁻¹)	% remoção
DQO particulada	23	94	6	98
DQO solúvel + coloidal	52	83	88	73
DQO total	75	89	94	84
Proteínas solúveis	7,5	92	10,1	93

As porcentagens de remoção de DQO total encontradas no presente trabalho são semelhantes às encontradas por Ruiz *et al.* (1997), que utilizaram água residuária proveniente de abatedouro, com filtração para retenção de sólidos com tamanho superior a 1mm, da mesma forma que se procedeu nos ensaios aqui relatados. Del Nery *et al.* (2002) também encontraram resultados semelhantes, com o mesmo lodo utilizado nesse trabalho, em um reator UASB com 430 m³ com 1228 dias de operação. As cargas utilizadas no presente trabalho se encontram na faixa utilizada por Ruiz *et al.* (1997). Todavia, quando operou reator tipo UASB com cargas superiores às aplicadas neste trabalho, Sayed *et al.* (1988) obteve desempenho inferior ao apresentado no que se refere à remoção da fração particulada da DQO.

As velocidades iniciais de utilização das frações de matéria orgânica, calculadas a partir do ajuste cinético realizado, encontram-se na Tabela 5.6.2.. Nota-se que a velocidade inicial de degradação de DQO total foi cerca de 32 pontos percentuais inferior no reator UASB. Dentro da fração total, tem-se a velocidade de redução da DQO particulada muito superior no RAHLF, sendo que a velocidade de decréscimo de DQO solúvel foi superior no UASB. É possível que parte da DQO particulada afluente ao RAHLF tenha sido filtrada no complexo “matrizes de poliuretano - biomassa”, como foi verificado visualmente, originando um valor significativamente mais elevado (cerca de 2,2 vezes maior) de velocidade de degradação de matéria orgânica particulada. Entretanto, após 31 dias de operação, não havia sinais de entupimento do leito, o que pôde ser confirmado quando o reator foi desmontado e o leito retirado. O que parece ter ocorrido foi a retenção inicial de biomassa que, posteriormente, foi consumida, sem causar dano algum ao regime hidrodinâmico do reator. Sayed *et al.* (1988) concluíram que um mecanismo importante na degradação das frações de DQO solúvel e coloidal, em reatores UASB, foi a adsorção. Em um estudo posterior (Sayed & Zeeuw, 1988), os autores concluíram que a composição do efluente, no que diz respeito a sólidos grosseiros, colóides e material solúvel, também afeta o processo de digestão anaeróbio em reatores UASB, por comprometer os diversos mecanismos envolvidos na degradação da matéria orgânica. Tais mecanismos seriam: a retenção de sólidos grosseiros e a adsorção de material solúvel e coloidal. Ambos os reatores utilizados nesse trabalho foram alimentados exatamente com o mesmo efluente, no entanto, a biomassa presente apresentava-se imobilizada de maneira muito distinta: como biofilme, em espumas de poliuretano no RAHLF, e em grânulos densos, no reator UASB, o que ocasiona propriedades físicas muito distintas no leito. Tal fato pode justificar a diferença encontrada nas velocidades de degradação das diversas frações de substrato utilizadas. No reator UASB, o mecanismo de adsorção do material colóide e solúvel nos grânulos parece ter regulado

o processo, resultando em maior velocidade de remoção dessas frações de matéria orgânica. No RAHLF, todavia, o que parece ter regulado o processo foi a retenção de sólidos orgânicos, aumentando, dessa forma, a velocidade de remoção dessa fração de matéria orgânica.

Tabela 5.6.2.: Velocidades iniciais de degradação de substratos nos dois reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves.

	RAHLF		UASB	
	v (mg . l ⁻¹ .h ⁻¹)	Erro	v (mg . l ⁻¹ .h ⁻¹)	Erro
DQO particulada	705,9	± 82,8	315,5	± 55,7
DQO solúvel + coloidal	285,4	± 31,0	---	---
DQO total	926,1	± 78,9	628,5	± 110,6
Proteínas solúveis	48,4	± 6,4	116,0	± 11,04

A Figura 5.6.11. ilustra o perfil de pH ao longo dos reatores. Nota-se que o pH manteve-se na faixa adequada para a degradação de matéria orgânica nos dois reatores. Não foi necessária a adição de fonte externa de alcalinidade para a manutenção do pH. O processo obteve alcalinidade necessária, provavelmente, devido à produção de nitrogênio na forma amoniacal, ilustrada na Figura 5.6.12.. O período de operação compreendeu cerca de 30 dias, tendo a alcalinidade total atingido os valores de 581,2 e 561,4 mg CaCO₃ . l⁻¹ nos reatores UASB e RAHLF, respectivamente. A eficiência média de remoção de DQO particulada foi de 98% para o reator tipo UASB e 94% para o RAHLF. A eficiência de remoção de matéria orgânica solúvel foi de 73% de 83% para os reatores UASB e RAHLF, respectivamente. Tais valores mostram, mais uma vez, que os processos anaeróbios são indicados para a degradação de águas residuárias provenientes de abatedouros, como já observaram Campos *et al.* (1986), Sayed *et al.* (1988), Tritt *et al.*(1991), Ruiz *et al.* (1997), entre outros. Todavia, é importante citar que houve remoção de sólidos maiores que 1 mm e também de gorduras antes do tratamento biológico, o que, de acordo com Sayed *et al.*(1988), é a chave para o sucesso da utilização de um reator UASB no tratamento dessas águas residuárias.

Figura 5.6.11: perfis de pH ao longo dos reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves, A: RAHLF. B: Reator tipo UASB.

Figura 5.6.12: Perfis de concentração de nitrogênio na forma amoniacal ao longo dos reatores utilizados no tratamento de água residuária proveniente de abatedouro de aves, A: RAHLF. B: Reator tipo UASB.

5.6.2. Análises Microbiológicas

As amostras dos reatores utilizados nesse ensaio foram submetidas a análises de microscopia óptica e de varredura. Nas análises de microscopia de varredura, foram detectadas as mesmas morfologias encontradas nos outros ensaios do presente trabalho, o que já era esperado, por ter sido utilizado o mesmo inóculo em todos os experimentos. A figura 5.6.13 mostra cocos, alguns filamentos, bacilos, bacilos retos e *Methanosaeta* observados na amostra.

Figura 5.6.13: Morfologias presentes nos reatores tratando água residuária proveniente de abatedouro de aves sob microscopia eletrônica de varredura: (a), cocos, e alguns filamentos; (b), bacilos, filamentos e uma morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*; (c), bacilos e filamentos; e (d), bacilos retos e curvos.

As amostras desprendidas das matrizes de poliuretano, ou provenientes do processo de maceração dos grânulos, foram levadas ao microscópio óptico e submetidas à contraste de fase e luz ultra-violeta para exame de auto-fluorescência. Todavia, não foi possível realizar a visualização com a clareza suficiente para estimar a frequência de aparição de todos os microrganismos, pois as amostras se encontravam muito sujas. Não se pôde, com isso, realizar a construção das Tabelas de frequência de aparição de todos os microrganismos presentes ao longo dos comprimentos dos reatores. Pôde-se somente detectar a presença ou predominância de algumas morfologias mais comuns presentes nos reatores. Dessa forma, foi possível a obtenção dos resultados presentes na Tabela 5.6.3..

Tabela 5.6.3: Frequência relativa de aparição dos microrganismos possíveis de visualização nas amostras provenientes dos reatores utilizados na degradação de água residuária de abatedouro de aves

Pontos de Amostragem										
	RAHLF							UASB		
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3
cocos	++++	++++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	++
<i>Methanosaeta sp.</i>	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++
bacilos	++	-	++	++	++	++	+++	++	++	++
filamentos	++	-	++	++	++	++	+++	++	++	-
víbios	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
cocobacilos	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-

+ : morfologias raramente presentes,
 ++: morfologias presentes,
 +++: morfologias presentes frequentemente e
 ++++: morfologias predominantes.

A Figura 5.6.14 mostra algumas das micrografias de contraste de fase das amostras provenientes do RAHLF com cocos em colônia, cocos isolados, morfologia semelhante à *Methanosaeta sp* e alguns tipos de bacilos. A Figura 5.6.15 contém algumas das micrografias provenientes das amostras oriundas do reator UASB com cocos, morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*, filamentos, e bacilos, que normalmente apresentaram fluorescência em outros ensaios.

Figura 5.6.14: Morfologias presentes ao longo do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves: (a) cocos em colônia, (b) cocos e morfologia semelhante à *Methanosaeta* sp., (c) pequenos bacilos retos, (d) morfologias semelhante à *Methanosaeta* sp., (e) bacilos e *Methanosaeta* sp., (f) um arranjo de bacilos.

Figura 5.6.15: Morfologias presentes ao longo do reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves: (a) cocos e morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*; (b) filamentos, cocos e morfologia semelhante à *Methanosaeta sp.*; (c) morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.*; e (d) bacilos.

Acredita-se que todas as morfologias encontradas nas análises microbiológicas realizadas nas amostras provenientes dos RAHLFs alimentados com efluentes sintéticos estejam presentes no consórcio responsável pela degradação da água residuária proveniente de abatedouro de aves, primeiramente, por tratar-se do mesmo inóculo utilizado e, também, devido às micrografias obtidas do microscópio de varredura. Todavia, devido à grande quantidade de sujeira nas amostras, não foi possível sua visualização. Também não foi possível a visualização de morfologias fluorescentes. Contudo, acredita-se que tais microrganismos estivessem presentes, já que o processo ocorreu de maneira estável e, para tanto, a ação das arqueas metanogênicas hidrogenotróficas é indispensável, no sentido de promover os compostos H_2 e CO_2 do meio. Inclusive, Del Nery *et al.* (2002), utilizando um reator UASB no tratamento do mesmo tipo de água residuária, com o mesmo inóculo, quantificaram microrganismos da família

Methanobacteriaceae (arquea metanogênica hidrogenotrófica) e duas espécies de arqueas metanogênicas acetoclásticas (*Methanosaeta* e *Methanosarcina*). Os autores concluíram que as arqueas metanogênicas predominaram nas amostras provenientes de todos os pontos de amostragem estudados.

As Figuras 5.6.16. à 5.6.19. mostram géis de eletroforese de DGGE que indicam a quantidade de populações relacionadas ao Domínio *Archaea*, presentes nos vários pontos de amostragem dos reatores.

A único microrganismo relacionado ao processo metanogênico foi a *Methanosaeta sp*, cuja morfologia é facilmente reconhecível através de microscopia ótica. Microrganismos com morfologia semelhante a essa estiveram presentes em ambos os reatores. Entretanto, o número de bandas presente nos pontos de amostragem de ambos os reatores indica que havia número muito superior de populações participando do processo metanogênico. Observando-se a Figura 5.6.16, pode-se contar 14 bandas no primeiro ponto de amostragem do RAHLF, 10 bandas no segundo, 13 bandas no terceiro e quarto ponto, e de 12 a 13 bandas do quinto ponto em diante, sendo que todas as bandas presentes do segundo ponto em diante se encontravam presentes no primeiro ponto. Por outro lado, pode-se observar na Figura 5.6.18, a presença de onze bandas no primeiro e segundo ponto de amostragem, e oito bandas no terceiro (todas também presentes no primeiro e segundo ponto de amostragem) do reator UASB. Não foi possível a visualização de nenhuma banda referente à presença de populações do Domínio *Archaea* no quarto e no quinto ponto de amostragem. O número de populações metanogênicas atuantes no início do RAHLF era ligeiramente superior às atuantes no UASB. O padrão de bandas não se modificou ao longo dos dois reatores; só houve a diminuição de algumas em relação aos pontos do início do reator. Tal fato indica que as Arqueas metanogênicas estavam presentes do início ao fim dos reatores, participando da degradação dos substratos presentes, tais como os ácidos voláteis, além de H_2 e CO_2 . A ausência de bandas referentes às populações do Domínio *Archaea* no quarto e quinto ponto de amostragem do reator UASB pode estar relacionada à falta desses substratos nessas regiões ou a um possível aumento no potencial Redox no meio, uma vez que esses dois pontos eram os mais próximos à superfície do reator, que era aberta e, portanto, exposta ao oxigênio.

Na Figura 5.6.17, pode-se observar o padrão de bandas referentes ao Domínio *Bacteria* presentes nas amostras coletadas ao longo do RAHLF. Nota-se a presença de onze bandas em todos os pontos de amostragem do reator. Tal fato possui duas implicações. Caso o processo de hidrólise tenha ocorrido realmente somente no início do reator, os microrganismos envolvidos em tal processo são os mesmos envolvidos na fermentação dos aminoácidos, com subsequente

geração de ácidos, e na geração de ácidos com subsequente geração de ácido acético, ao longo de todo o reator. Caso o processo de hidrólise protéica tenha se dado ao longo de todo o reator, é possível inferir que houve a presença dos mesmos substratos também ao longo de todo o reator, razão pela qual não houve mudança significativa no padrão de bandas nos diversos pontos de amostragem. Tal fato indica que a composição da biomassa provavelmente não variou ao longo do reator. A segunda implicação é sustentada pela Figura 5.6.4, que demonstra que a concentração de proteínas foi consumida lentamente ao longo de todo o reator. Todavia, de posse do presente conjunto de dados, não é possível informar se a hidrólise protéica ocorre no início ou ao longo de todo o reator. Na Figura 5.6.19, tem-se o padrão de bandas encontrado para os cinco pontos de amostragem do UASB. Nota-se que o padrão de bandas nos três primeiros pontos de amostragem é o mesmo, totalizando cerca de 14 bandas. Nos dois últimos, há uma sensível variação nesse número, que diminui para 6 no quarto ponto de amostragem, e cinco no quinto ponto de amostragem, sendo que, além disso, uma das bandas presentes no quinto ponto está ausente no quarto ponto. Esse resultado foi sensivelmente diferente do resultado encontrado para o Domínio *Archaea*, que indicou ausência total de populações nesses dois pontos de amostragem. Esse fato pode contribuir para a idéia de um possível aumento do potencial Redox no meio, já que segundo McInnerney (1988), grande parte das bactérias envolvidas na hidrólise protéica e fermentação de aminoácidos é anaeróbia facultativa.

Figura 5.6.16 — Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (45,1% - 58,44% valores de percentagem do gradiente desnaturante).

Figura 5.6.17 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do RAHLF alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (38,8% - 50,44% valores de percentagem do gradiente desnaturante).

Figura 5.6.18 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio *Archaea* nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4 e 5 do Reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (40,6% - 52,22% valores de percentagem do gradiente desnaturante).

Figura 5.6.19 – Diversidade de microrganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria* nas amostras provenientes dos pontos de amostragem 1, 2, 3, 4 e 5 do Reator UASB alimentado com água residuária proveniente de abatedouro de aves (43,2% - 56,6% valores de percentagem do gradiente desnaturante).

Não foi possível a utilização da técnica de hibridação *in situ* nas amostras provenientes dos reatores, devido à presença de sujeira que impossibilitou a contagem dos microrganismos. Entretanto, os resultados encontrados com a utilização da técnica de DGGE foram extremamente proveitosos para o presente trabalho de pesquisa principalmente por demonstrar que a quantidade de populações envolvidas na degradação da água residuária proveniente de abatedouro de aves foi superior àquela estimada pelas análises de microscopia óptica. A não visualização de grande variedade de nas análises de microscopia foram devido a grande quantidade de sujeira presente nas amostras, proveniente provavelmente da água residuária tratada.

Capítulo 6

Conclusões

- 1) Os resultados preditos pelo modelo proposto apresentaram boa correlação com os dados experimentais e com isso foi possível o entendimento dos vários aspectos envolvidos na degradação de diferentes tipos de proteínas em reatores de filme fixo com regime de escoamento predominantemente pistonado.
- 2) Os resultados obtidos permitem concluir que o processo de digestão anaeróbia é indicado para a degradação de proteínas ou produtos de sua hidrólise, nas concentrações estudadas. Em sistemas cuja alimentação é composta por proteína hidrolisada como fonte de carbono, como a peptona, o desbalanceamento do sistema pode ser evitado ou minorado, devido à produção de alcalinidade proveniente da geração do íon amônio. Em contrapartida, em sistemas alimentados com efluentes compostos por proteínas íntegras, o acúmulo de ácidos pode ser prevenido devido à baixa velocidade de hidrólise de tais compostos. Com isso, tem-se praticamente a garantia de sucesso na degradação desse tipo de matéria orgânica, caso sejam respeitadas as necessidades básicas do consórcio anaeróbio microbiano.
- 3) De maneira geral, comparando-se os resultados de frequência relativa provenientes das análises de FISH e das observações ao microscópio óptico, foi possível concluir que, na impossibilidade da realização da técnica do FISH, as observações ao microscópio óptico podem fornecer bons resultados, os quais, todavia, devem ser interpretados com cuidado, somente como estimativa de frequência, devido à sua natureza subjetiva.
- 4) Os resultados encontrados com a utilização da técnica de DGGE foram extremamente proveitosos para o presente trabalho de pesquisa principalmente por demonstrar que a

quantidade de espécies envolvidas na degradação da água residuária proveniente de abatedouro de aves foi superior àquela estimada pelas análises de microscopia óptica, subestimada devido à grande quantidade de sujeira presente nas amostras.

- 5) Em relação à velocidade de degradação dos substratos protéicos, pôde-se concluir que a peptona foi mais rapidamente consumida, provavelmente devido à sua forma hidrolisada. A caseína foi consumida mais rapidamente que a SAB o que reafirma a citação de McInerney (1988), a qual indica que nem sempre proteínas mais solúveis são consumidas mais rapidamente.
- 6) A concentração afluyente de bicarbonato de sódio igual a 1 g.l^{-1} desencadeou um processo de inibição da metanogênese no processo anaeróbio de degradação de peptona. O efeito pode ter sido gerado tanto pelo excesso de sódio quanto pelo favorecimento de uma rota alternativa de homoacetogênese heterotrófica. Todavia, cabe ressaltar que os problemas operacionais encontrados realmente foram impulsionados pela elevada velocidade inicial de degradação de peptona, já que não se observou problema semelhante nos reatores alimentados com efluentes sintéticos a base de caseína e S.A.B..
- 7) O processo de degradação anaeróbia de caseína se mostrou mais estável no reator cujo tempo de adaptação do lodo foi maior.
- 8) Quando as proteínas ou seus produtos de hidrólise foram a única fonte de carbono presente no meio, sua degradação em meio anaeróbio gerou mais acetato do que propionato.
- 9) Os resultados encontrados nesse trabalho, com reatores em escala de bancada com regime hidrodinâmico semelhante ao pistonado, não justificam a separação de proteínas e carboidratos, nem para a otimização da degradação de matéria orgânica, nem para a otimização da degradação de proteínas, como o sugerido por Martins *et al.* (1991) e Breure *et al.* (1986).
- 10) A produção de propionato via degradação de proteínas ou derivados de sua hidrólise foi favorecida após a adição de lipídeos.
- 11) A presença de lipídeos no afluyente se constituiu no maior problema para o processo estudado. Em todos os ensaios realizados, observou-se a diminuição do valor da velocidade inicial de degradação de proteínas ou seus derivados. Esse fato isoladamente não seria suficiente para condenar a presença de lipídeos como problema ao processo de degradação anaeróbia de proteínas ou seus derivados. Todavia, observou-se também a diminuição na eficiência de remoção dessas moléculas, bem como o aumento no teor

residual de ácidos voláteis, diminuindo, dessa forma, de maneira drástica, a eficiência na remoção de DQO. Após a adição dos lipídeos, a estabilidade dos reatores foi sempre comprometida, sendo que os maiores problemas foram observados nos processos tidos como os menos estáveis.

- 12) O modelo cinético de primeira ordem se ajustou bem aos dados de decaimento de matéria orgânica coletados dos reatores UASB e RAHLF tratando água residuária proveniente do abatedouro de aves.
- 13) No reator UASB, o mecanismo de adsorção do material colóide e solúvel nos grânulos parece ter regulado o processo, resultando em maior velocidade de remoção dessas frações de matéria orgânica. No RAHLF, todavia, o que parece ter regulado o processo foi a retenção de sólidos orgânicos, aumentando, dessa forma, a velocidade de remoção dessa fração de matéria orgânica.
- 14) As morfologias encontradas foram comuns em todos os ensaios realizados, tendo predominado as morfologias semelhantes à *Methanosaeta sp.*, bacilos fluorescentes (3 tipos) bacilos não fluorescentes (6 tipos), bacilos curvos e cocos não fluorescentes. Também foram visualizados três tipos de filamentos, espiroquetas e morfologias semelhantes à *Methanosarcina sp.*.
- 15) As análises microbiológicas demonstraram que houve realocação da biomassa a medida que foram adicionados fontes alternativas de carbono aos efluentes sintéticos a base de proteínas ou seus derivados, tendo sido esse fenômeno provavelmente um dos responsáveis pela estabilidade encontrada nos processos estudados nos RAHLFs.

Capítulo 7

Sugestões

Como principal sugestão futura tem-se a aplicação do modelo cinético proposto no presente trabalho a uma água residuária real com elevado teor protéico e baixo teor de sólidos suspensos, inicialmente em um RAHLF em escala de bancada, e posteriormente em um RAHLF em escala piloto.

Como investigação secundária, todavia não menos importante, sugere-se a averiguação da influência da deficiência de ferro na produção de polímeros extracelulares, uma vez que não foi observada abundância de estruturas desse tipo na operação dos RAHLFs tratando água residuária proveniente do abatedouro de aves, e efluente sintético a base de caseína com suplementação de ferro. Nas outras condições estudadas, ao final dos experimentos, observou-se elevada concentração dessas substâncias principalmente no início do leito do reator.

Como última sugestão, propõe-se a investigação mais detalhada dos efeitos negativos observados no presente trabalho de pesquisa, o efeito da presença de lipídeos no processo de degradação de proteínas ou seus derivados, e o efeito da elevada concentração de bicarbonato de sódio na degradação de proteínas hidrolisadas. Para a investigação a respeito da presença de lipídeos, sugere-se submeter RAHLFs com efluentes a base de proteínas a concentrações crescentes de óleo de soja. Todavia, em vez de detergente, propõe-se a emulsificação do óleo com goma xantana (que constituiriam a fonte de carboidratos) como realizado por Silva (2002).

Bibliografia Consultada

1. Abe, D.S. (1998). *Desnitrificação e caracterização filogenética das bactérias de vida livre e bactérias aderidas às partículas no hipolímio do lago Kizaki, Japão*. Tese de Doutorado SHS - EESC - USP, 106p.
2. Amann, R.I., Binder, B.G., Olson, R.J., Chrischold, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S rRNA-target oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, **56**, 1919 – 1925.
3. Amman, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**, 143 – 169.
4. Aquino, S.F. & Stuckey, D.C. (2002) Production of soluble microbial products (SMP) in anaerobic reactors under stress conditions. In: *Memorias / Proceedings / Anais VII – Trabajos Orales - Taller y Simposio Latinoamericano Sobre Digestión Anaerobia*, Mérida, Yucatán, México, 49 – 56.
5. Araujo, J.C. (1995) *Caracterização e evolução do biofilme em reator anaeróbio de leito fluidificado alimentado com esgoto sanitário sintético*. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos 158p.
6. Bishop, P.L. (1997) Biofilm structure and kinetics. *Water Science Techenology* **36**, 1 287-294.
7. Blackburn, T.H. & Hobson, P.N. (1962) Further studies on isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *J. Cienn. Microbiol.* **29**, 69 – 81
8. Bobbio, P.A. & Bobbio, F.O. (1992). *Bioquímica dos Alimentos*. 2ª Edição, Livraria Varela, SP, 223p.
9. Barker, H.A. (1981) Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual Reviews Biochemistry*, **50**, 23 – 40.
10. Biagini, G.A. McIntyre, P.S., Finlay, B.J. and Lloyd, D. (1988) Carbohydrate and amino acid fermentation in the free-living primitive protozoon *Hexamita* sp. *Aplied and Environmental Microbiology*, **64**, 1, 203 – 207.

11. Breure, A.M., Mooijman, K.A., Van Andel, J.G. (1986). Protein degradation in anaerobic digestion: influence of volatile fatty acids and carbohydrates on hydrolysis and acidogenic fermentation of gelatin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **24**, 426-431.
12. Brosius, J., Dull, T. L., Sleeter, D. D., Noller, H. F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, **48**, 107 – 127.
13. Campos, J.R. (1992). Um estudo sobre reatores anaeróbios de leito expandido. In: *II Taller Regional Sobre Tratamiento Anaeróbico de Águas Residuales en América Latina*. Habana, 298p.
14. Campos, J.R. (1994). Biomassa fixa: reatores anaeróbios. In: *III Taller Y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"*. Montevideo, Uruguay, 69 - 184.
15. Costerton, J.B., Geesey, G.G., Cheng, K.-J. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am*, **238**, 1, 86 - 95.
16. De Nardi, I.R., Zaiat M., Foresti E. (1999) Influence of the tracer characteristics on hydrodynamic models of packed-bed bioreactors. *Bioprocess Engineering*, **21**, 469-476.
17. Del Neri, V., Gianotti, E.P., Damianovic, M.H.Z., Domingues, M.R.D., Zaiat, M. (2002) Granules characteristics in the profile of a plant scale up flow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. In: *Memorias / Proceedings / Anais VII Taller y Simposio Latinoamericano Sobre Digestión Anaerobia*, Mérida, Yucatán, México, 579 – 585.
18. Dolfing, J. (1988). Acetogens. In: Zendher, A., J. B., *Biology of Anaerobic Microorganisms*, 417 – 468 (Zendher, A., J. B.) John Wiley & Sons, New York.
19. Domingues, M.R. (2001) *Avaliação de metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas*. Dissertação de Mestrado-SHS - EESC - USP, 132p.
20. Droste, R.L. & Kennedy, K.J. (1986). Sequential substrate utilization and effectiveness factor in fixed biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**, 1713 – 1720.
21. Fang, H. H. P. & Wai Chung-Chung D. (1999). Anaerobic treatment of pertinacious wastewater under mesophilic and termophilic conditions. *Water Science Technology*, **40**, 1, 77 – 84.

22. Foresti, E. (1994). Fundamentos do processo de digestão anaeróbia. In: *III Taller Y Seminario Latinoamericano "Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales"*. Montevideo, Uruguay, pp. 97 - 110.
23. Gadelha, R.F, Baságli, C.D., Blundi, C.E. (2000) Remoção de matéria orgânica específica de um sistema de flotoozonização como pós tratamento de reatores anaeróbios. In: Chernicharo, C. A. L. (org), *Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios-Coletânea de Trabalhos Técnicos*, Prosab, Belo Horizonte, **1**, 181-188
24. Greenberg, A. E., Clesceri, L. S & Eaton, A. D. (1992) *Standard methods for examination of water and wastewater*, 18th edition.
25. Griffiths, R.I.; Whiteley, A.S.; O'Donnell, A.G.; Bailey, M.J. (2000). Rapid method for otraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5488-5491.
26. Hahn, D., Amann, R.I., Ludwig, W., Akkermans, A. D. L., Sheileifer, K. H. (1992). Detection of microorganisms in soil after *in situ* hybridization with rRNA target, fluorescent labeled oligonucleotides. *Journal of General Microbiology*, **138**, 879 – 887.
27. Harper, S.R. & Pohland, F.G. (1986). Recent development in hydrogen management during wastewater treatment. *Biotechnology & Bioengineering*, **28**, 585 – 602.
28. Heuer, H. and Smalla, K. (1997) Evaluation of community level catabolic proçling using OLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *Journal of Microbiology Methods* **30**, 49-61.
29. Huysman, P., Van Meenen, P., Van Assche, P. & Verstrete, W. (1983). Factors affecting the colonization of non porous and porous packing materials in model up flow methane reactors. *Biotechnology Letters*, **5**, 9, 663 - 648 .
30. Ishida, Y. Fujita, T. Asai, K. (1981) New detection and separation method for amino acids by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography*, **204**, 234 - 256.
31. Jenkinson, H.F. & Lappin-Scott, H.M. (2001) Biofilms adhere to stay, *Trends in Microbiology*, **9**, 1, 125.
32. Kudo, Y.; Nakajima, T.; Miyaki, T.; Oyaizu, H. (1997). Methanogen flora of paddy soils in Japan. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 39-48.

33. Lewandowski, Z., Walser G. & Characklis, W.G. (1991), Reaction kinetics in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 877-882.
34. Lens, P.N.L., Visser, A. , Janssen A. J.H., Hulshoff Pol, L. W. and Lettinga, G. (1998). Biotechnological Treatment of Sulfate-Rich Wastewaters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **28**, 1, 41 – 88.
35. Laemmili, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, **227**, 680 – 685.
36. Lobos, J.; Chamy, R.; Aroca, G. (1998). Determinación de los parámetros cinéticos requeridos en la modelación de la digestión anaerobia. In: *V Taller y Seminario Latinoamericano TRATAMIENTO ANAERÓBIO DE AGUAS RESIDUALES*, 27-30 october, Viña del Mar, Chile.
37. McCarty, P. L., & McKinney, R. E. (1961). Salt toxicity in anaerobic digestion. *Journal Water Pollution Control Fed.* **33**, 399 – 415.
38. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (1997). *Brock-Biology of microorganisms* –18th Edition, Prentice Hall, NJ, 986p.
39. Mah T-F.C & O'Toole, G.A.(2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, **9**, 1, 127-128.
40. Martins, V.M.N.C.; Vitoratto, E; Schmidell, W. (1991). Degradação anaeróbia de proteínas. In: *Anais da Fenabio Biolatina* **91**, pp. V – 141.
41. McInerney, M.J. (1988). Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: Zehnder, A. J. B. *Biology of anaerobic microorganisms*. Ed. John Wiley & Sons, Inc, 381 - 402.
42. Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probe for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. *Systematic Applied Microbiology*, **15**, 593 – 600.
43. Moraes, E.M., Adorno, M.A.T., Zaiat, M., Foresti, E. (2000) Determinação de ácidos voláteis por cromatografia gasosa em efluentes de reatores anaeróbios tratando resíduos líquidos e sólidos. In: *Anais, Volume II da VI OFICINA e SEMINÁRIO LATINO AMERICANO de DIGESTÃO ANAERÓBIA*. Recife, 146-149.

44. Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, **59**, 695-700.
45. Nation, J. L. (1983) A new method using hexamethyldisilane for preparation of soft tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technology*, **58**, 347-351
46. Nagase, M. & Matsuo, T. (1982). Interactions between amino-acid-degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 2227 - 2239.
47. Nelson, D.L., Cox, M.M.(2000). *Principles of Biochemistry* – Third Edition , Worth, 1152p.
48. North, A.C.T. & Atwood, T.K (1991). *Protein Structure*. Burlington: Cbr, 31p.
49. Pascik, I. (1990). Modified polyurethane carriers for biochemical waste water treatment. *Water Science Technology*, **22**, 1/2, 33 - 42.
50. Perle, M., Kimchie, S. & Shelef, G. (1995) Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of dairy wastewater. *Water Research*, **29**, 6, 1549-1554.
51. Peterson, G. L. (1979) Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical Biochemistry*, **100**, 201 – 219.
52. Petrury, R. & Lettinga, G. (1997) Digestion of a milk – fat emulsion. *Bioresource Technology*, **61**, 141 – 149.
53. Polprasert, C. and Haas, C.N. (1995). Effect of sulfate an anaerobic process fed with dual substrates. *Water Science Technology*, **31**, 101 – 107.
54. Rajeshwari, K.V., Balakrishnan, M., Kansal, A., Lata, K., Kishore, V.N.V. (2000) State-of-the-art of anaerobic digestion technology for industrial wastewater treatment. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, **4**, 135 – 156.
55. Raunkjaer, K., Hvitved-Jacobse, T., Nielsen, P.H. (1993) Measurement of pools of protein carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*.
56. Raskin, L.; Stromley, J.M.; Rittman, B.E.; Stahl, D.A. (1994). Group specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Applied Environmental Microbiology*, **60**, 1232 – 1240.

57. Rodriguez-Martinez, J., Rodríguez-Garza, I., Pedraza-Flores, E., Balagureisamy, N., Sosa-Santillan, G., Garza-García, Y. (2002). Kinetics of anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in batch and up flow anaerobic sludge blanked reactor. *Bioresource Technology*, **850**, 235-241.
58. Rossien, J.R.C. & Villarrez, P.A.(1963) Determination of ammonia by the indophenol method. *Journal of American. Water Works Association*, **55**, 657.
59. Ruiz, I., Veiga, M.C., De Santiago, P. & Blásquez, R (1997). Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Bioresource Technology*, **60**, 251-258
60. Sanders, E.M. & Ough, C.S. (1985) Determination of free amino acids in wine by HPLC. *Am. J. enol. Vatic.*, **36**, 1, 234 – 240.
61. Sayed S., van der Zanden J., Wijffels, R. and Lettinga G. (1988) Anaerobic degradation of the various fractions of slaughterhouse wastewater *Biological Wastes*, **23**, 2, 117-142.
62. Sayed, S. and de Zeeuw ,W. (1988). The performance of a continuously operated flocculent sludge UASB reactor with slaughterhouse wastewater *Biological Wastes*, **24**, 3, 199 – 212.
63. Sayed, K.I.S. (1987). *Anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater using the UASB process*. [PhD Thesis], pp 10 – 16.
64. Schiavuzzo, M.A. (1997). *Estudos da degradação microbiana anaeróbia de proteínas (gelatina) em lodo de esgoto processado em reator anaeróbio de fluxo ascendente alimentado com substrato sintético com ênfase à cinética e produtos de hidrólise*. Tese de Doutorado – Departamento de Hidráulica e Saneamento / Escola de Engenharia de São Carlos / Universidade de São Paulo, 279p.
65. Schleifer, K.H. (1984) Gram positive cocci, Section 12 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* –2. Eds. N. R. KRIEG & J. G. HOLT 1599p.
66. Siebert, M.L. & Toerien, D.F. (1968). The proteolytic bacteria present in the anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, **3**, 241 -250.

67. Silva, D.J. , Modolo, M.R., Varesche, M.B.A., Blundi, C.E. and Zaiat, M.(2002) Tratamento de águas residuárias com alta concentração de lipídeos em sistema de reatores combinados enzimático / biológico. In: *Memorias / Proceedings / Anais VII – Posters - Taller y Simposio Latinoamericano Sobre Digestión Anaerobia*, Mérida, Yucatán, México, 305 – 312.
68. Speece, R.E. (1983). Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*. **17**, 9, 467A-427A.
69. Speece, R.E. (1996). *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater*. Ed. Archae Press, Nashville, Tennessee, 394p.
70. Stams, A.J.M. & Hansen, T.A. (1984) Fermentation of glutamate and other compounds by *Acidaminobacter hydrogenoformans* gen. nov. sp. Nov., an obligate anaerobe isolated from black mud. Studies with pure cultures and mixed cultures with sulfate reducing and methanogenic bacteria. *Arch. Microbiology*. **137**, 329 -337.
71. Stams, A.J.M.(1994) Metabolic interactions between anaerobic bacteria in methanogenic environments. *Antonie van Leeuwenhoek*, **66**, 271 – 294.
72. Stewart, P.S. (2001). Multicellular Resistance: biofilms. *Trends in microbiology*. **9**, 5 pp. 204.
73. Stoscheck, C.M. (1990) Quantitation of protein. *Methods in enzymology*. **182**, 325 - 332
74. Suterland, I.W. (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. **9**, 5, 222-227.
75. Tommaso, G. (1999) *Estrutura caracterização e cinética de lodo anaeróbico imobilizado em espuma de poliuretano tratando substrato sintético contendo proteína como única fonte de carbono*. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, 111p.
76. Tommaso, G, Varesche, M.B.A., Zaiat, M., Vazoller, R.F., Foresti, E.(2002) Morphological observation and microbial population dynamics in anaerobic polyurethane foam biofilm degradating gelatin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **19**, 03, 287-292.
77. Torres, P. (1992). *Desempenho de um reator anaeróbico de manta de lodo (UASB) de bancada no tratamento de substrato sintético simulando esgoto sanitário*. Dissertação de Mestrado - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo. São Carlos, S.P. 185p.

APÊNDICE I

Dados obtidos nos perfis experimentais realizados nos RAHLFS utilizados na modelagem cinética da degradação dos substratos usados e metabólitos produzidos.

Tabela I.1.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. (DQO = 400 mg.*l*⁻¹) como fonte de carbono

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)
0	0	0	351,5	0,0	0,0	351,5
2	18,0	5,5	280,1	32,7	7,1	294,0
4	34,2	13,0	232,2	42,1	10,7	246,0
6	48,7	-	196,1	42,2	12,0	205,8
8	38,7	15,8	137,6	38,7	12,1	172,1
10	35,8	15,1	110,1	34,2	11,4	144,0
12	27,4	10,4	93,3	29,7	10,4	120,5
14	36,2	9,3	84,4	25,4	9,3	100,8
16	28,5	9,8	58,3	21,6	8,1	84,3
18	18,4	6,5	54,4	18,3	7,1	70,5
20	4,4	3,3	42,9	15,5	6,1	59,0

Tabela I.2.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. e carboidratos como fonte de carbono.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Carboidratos (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Carboidratos (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)
0	0	0	348,6	134,3	0,00	0,00	348,6	134,4
2	20,6	11,8	288,6	79,1	37,5	18,4	296,1	102,3
4	47,5	19,9	264,7	70,7	47,4	19,8	251,5	77,8
6	50,6	22,0	207,6	49,6	45,3	16,8	213,6	59,2
8	39,1	14,9	172,6	45,0	39,4	13,3	181,4	45,1
10	13,1	1,4	157,6	38,8	33,0	10,3	154,0	34,3
12	22,6	2,2	142,9	34,1	27,3	7,9	130,8	26,1
14	25,0	2,1	128,3	-	22,5	6,0	111,1	19,9
16	29,0	11,6	94,4	24,3	18,5	4,6	94,4	15,1
18	14,1	5,5	54,4	21,5	15,3	3,5	80,1	11,5
20	-	-	33,3	22,1	12,6	2,6	68,1	8,8

Tabela I.3.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B., carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)
0	0	0	313,2	150,1	0,0	0,0	313,3	150,1
2	38,8	13,0	261,5	73,5	35,2	11,9	280,8	118,7
4	46,0	16,8	246,1	63,2	48,4	16,8	251,6	93,9
6	45,7	17,2	210,0	53,2	51,0	18,2	225,5	74,3
8	43,4	17,9	186,1	47,9	48,6	17,9	202,1	58,7
10	41,2	16,9	186,1	56,4	44,3	16,9	181,1	46,5
12	42,3	17,6	170,2	35,5	39,4	15,5	162,3	36,7
14	38,2	16,0	154,3	32,3	34,6	14,1	145,5	29,1
16	31,3	13,6	130,4	23,0	30,2	12,7	130,4	23,0
18	27,3	11,3	116,8	25,5	26,4	11,4	116,9	18,2
20	23,0	9,7	93,2	24,4	23,0	10,2	104,7	14,4

Tabela I.4.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com S.A.B. (DQO = 400 mg.l⁻¹) como fonte de carbono

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)
0	0	0	448,6	0,0	0,0	448,6
2	26,1	9,1	379,4	9,1	9,1	375,3
4	37,1	11,5	332,9	13,6	13,6	314,0
6	33,9	12,6	294,4	15,3	15,3	262,6
8	41,1	12,7	219,7	15,4	15,4	219,7
10	47,7	14,7	192,9	14,6	14,6	183,8
12	37,3	12,8	-	13,3	13,3	153,8
14	39,2	12,5	154,4	11,9	11,9	128,6
16	30,7	10,5	131,5	10,4	10,4	107,6
18	22,8	8,1	95,4	9,07	9,0	90,0
20	21,6	6,3	92,6	7,7	7,7	75,3

Tabela I.5.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 400 mg.*l*⁻¹) como fonte de carbono e 1 g .*l*⁻¹ de bicarbonato de sódio

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg . <i>l</i> ⁻¹)
0	0	0	171,9	0	0	171,9
2	48,0	28,1	62,2	43,3	26,5	92,4
4	64,2	38,0	49,7	57,8	34,9	49,7
6	48,8	31,6	33,3	58,5	34,9	26,7
8	54,6	31,3	34,4	53,1	31,3	14,3
10	65,5	33,5	21,0	45,6	26,6	7,7
12	38,0	25,4	15,5	38,0	21,9	4,1
14	23,7	15,8	14,9	31,0	17,7	2,2
16	-	-	-	25,0	14,1	1,2
18	20,8	12,1	11,6	20,0	11,2	0,6
20	-	19,6	10,8	15,9	8,8	0,3

Tabela I.6.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona e carboidratos como fonte de carbono e 1 g .*l*⁻¹ de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Carboidratos (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg . <i>l</i> ⁻¹)	Carboidratos (mg . <i>l</i> ⁻¹)
0	0	0	156,9	152,7	0	0	156,9	152,7
2	65,3	31,3	89,4	31,9	63,8	23,1	121	88,0
4	69,4	33,7	65	20,0	88,8	33,7	93,3	50,7
6	71,4	35,4	41,4	17,3	93,4	37,3	71,9	29,2
8	77,5	37,16	42,8	16,8	88,1	37,1	55,5	16,8
10	70	35,2	42,8	16,5	78,6	35,2	42,8	9,7
12	68,2	32,4	24,7	13,6	67,8	32,4	33,0	5,6
14	57,4	29,7	33,6	17,5	57,4	29,3	25,4	3,2
16	55,4	26,5	25	14,5	47,9	26,2	19,6	1,9
18	42,2	21,2	19,7	13,9	39,7	23,2	15,1	1,1
20	46,3	22	18,9	13,9	32,7	20,6	11,6	0,6

Tabela I.7.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono e 1 g .l⁻¹ de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)
0	0	0	153,1	131,3	0	0	153,2	131,3
2	69,1	39,5	119,3	26,8	79,5	56,4	119,3	26,8
4	124,5	83,6	88,6	5,1	103,2	75,8	93	5,5
6	138,8	87	70,5	3,7	115,2	83,2	72,4	1,1
8	150,7	89,2	60,4	4,9	124,1	85,2	56,4	0,2
10	191,7	101,8	49,0	3,0	131,6	84,0	44	-
12	153,5	80,8	42,4	4,6	137,9	80,8	34,3	-
14	169,3	81,3	48,7	4,6	143,0	76,3	26,7	-
16	146,8	69,8	50,9	9,7	146,9	71,1	20,8	-
18	130,2	59	50,6	8,5	149,6	65,5	16,2	-
20	132	58,9	43,6	9,0	151,4	59,9	12,6	-

Tabela I.8.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) como fonte de carbono e 1 g .l⁻¹ de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)
0	0	0	244,2			
2	76,8	45,1	160,8			
4	105,2	61,6	150,8			
6	151	78,4	97,2			
8	202,4	102,7	62,7			
10	193,5	86,2	55,5			
12	194,7	75,5	44,7			
14	195,9	74,3	42,4			
16	212	69,9	38,5			
18	193,9	62,3	36,0			
20	201,5	61	28,0			

Tabela I.9.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 400 mg. L^{-1}) como fonte de carbono e 400 mg L^{-1} de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg L^{-1})	Ácido propiônico (mg L^{-1})	Proteínas (mg L^{-1})	Ácido acético (mg L^{-1})	Ácido propiônico (mg L^{-1})	Proteínas (mg L^{-1})
0	0	0	178,7	0	0	178,7
2	32,1	18,9	82,0	35,1	19,8	109,2
4	43,6	26,7	47,8	43,6	25,3	66,7
6	43,2	-	32,4	40,7	24,3	40,7
8	31,5	19,5	25,8	33,9	20,7	24,9
10	26,6	16,6	19,9	26,6	16,6	15,2
12	20,1	11,9	8,7	20,1	12,7	9,3
14	15,5	8,9	10,8	14,8	9,54	5,7
16	13,6	7,8	11,6	10,7	6,99	3,5
18	10,3	6,3	10,3	7,64	5,05	2,1
20	9,3	5,3	10,83	5,39	3,6	1,3

Tabela I.10.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona e carboidratos como fonte de carbono e 400 mg L^{-1} de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg L^{-1})	Ácido propiônico (mg L^{-1})	Proteínas (mg L^{-1})	Carboidratos (mg L^{-1})	Ácido acético (mg L^{-1})	Ácido propiônico (mg L^{-1})	Proteínas (mg L^{-1})	Carboidratos (mg L^{-1})
0	0	0	214,9	112,6	0	0	215	112,6
2	43,6	23,2	149,5	32,9	69,7	24,6	160,5	46,4
4	52,5	31,2	122,4	19,0	78,9	36,3	119,9	19,1
6	70,5	44,1	83,7	6,1	70,6	40,2	89,5	7,9
8	59	39,3	49,9	5,3	58,9	39,6	66,9	3,2
10	53,8	36,6	36,6	-	48,1	36,6	49,9	1,3
12	-	32,7	-	4,5	39,1	32,4	37,3	0,5
14	31,8	20,7	29,5	-	31,8	28,0	27,8	0,2
16	26,7	18	20,8	1,4	25,8	23,6	20,8	0,1
18	30,8	19,7	24,1	-	20,8	19,7	15,5	-
20	34,2	21,2	25,3	3,5	16,8	16,1	11,6	-

Tabela I.11.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono e 400 mg .l⁻¹ de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)
0	0	0	220,8	110,2	0	0	220,8	110,3
2	42,1	25	170,3	42,3	66,5	29,4	178,2	46,6
4	63,3	36,4	119,9	18,2	92,2	43,3	143,7	19,7
6	64,9	36,3	96,2	8,2	100,7	47,9	116	8,3
8	89,8	48	85,3	4,9	101,4	47,2	93,6	3,5
10	101,7	43,8	60,8	-	98,1	43,8	75,5	1,5
12	39,4	25,4	-	3,8	92,7	39,1	60,9	0,6
14	83,5	29,6	49,1	-	85,9	34,0	49,1	0,3
16	80,8	31,1	56,2	3,8	78,5	29,1	39,7	0,1
18	71,6	24,6	48,3	-	70,7	24,6	32	-
20	76,2	24,9	45,3	2,3	63,0	20,5	25,8	-

Tabela I.12.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com peptona (DQO = 600 mg.l⁻¹) como fonte de carbono e 400 mg .l⁻¹ de bicarbonato de sódio.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)
0	0	0	306,2	0	0	306,2
2	30,9	17,2	210,8	45,0	17,2	234,5
4	37	19,8	206,2	69,3	25,2	179,5
6	56,37	-	137,4	79,7	27,7	137,5
8	78,54	27,0	93,3	81,1	27,1	105,3
10	89,82	24,9	68,3	77,3	24,9	80,6
12	86,6	22,3	54,9	70,5	21,9	61,7
14	69	19,1	47,0	62,3	18,8	47,3
16	51,2	15,6	39,1	53,9	15,8	36,2
18	44,8	12,6	33,3	45,8	13,1	27,7
20	48	12	32,8	38,4	10,7	21,2

Tabela I.13.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg.*l*⁻¹) como fonte de carbono e 28 dias de tempo de adaptação da biomassa.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)
0	0	0	259,8	0	0	259,8
2	37,1	24,3	119,3	50,3	18,1	162,2
4	34,7	23,5	46,8	53,9	25,4	101,2
6	38	23,0	41,3	44,6	26,8	63,2
8	33,8	21,4	41,3	33,7	25,3	39,4
10	34,9	21,7	40,3	24,6	22,4	24,6
12	34,2	21,9	-	17,7	19,2	15,3
14	34,4	22,6	15,6	12,7	16,0	9,6
16	24,1	15,9	6	9,2	13,1	5,9
18	15,6	10,7	3,7	6,6	10,6	3,7
20	12,1	8,1	1,4	4,8	8,5	2,3

Tabela I.14.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg.*l*⁻¹) como fonte de carbono e 65 dias de tempo de adaptação da biomassa.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido acético (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Ácido propiônico (mg. <i>l</i> ⁻¹)	Proteínas (mg. <i>l</i> ⁻¹)
0	3,8	0,2	202,4	0	0	202,5
2	25,3	7,0	131,7	36,1	7,7	127,6
4	28,3	11,7	69,6	34,7	8,3	80,4
6	26,1	10,8	41,0	26,1	6,7	50,7
8	24,8	6,9	29,9	18,0	4,9	32,0
10	23,6	4,7	13,5	12,0	3,4	20,1
12	10,5	4,0	9,2	7,8	2,3	12,7
14	16,1	2,5	6,3	5,0	1,5	8,0
16	13	1,2	1,7	3,2	0,9	5,0
18	4,31	0,6	2,8	2,0	0,6	3,2
20	4,75	0,5	2,1	1,3	0,4	2,0

Tabela I.15.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína (DQO = 400 mg. l^{-1}) como fonte de carbono e 10 mg . l^{-1} de sulfato ferroso.

L/D	Valores obtidos experimentalmente			Valores previstos pelo modelo		
	Ácido acético (mg . l^{-1})	Ácido propiônico (mg . l^{-1})	Proteínas (mg . l^{-1})	Ácido acético (mg . l^{-1})	Ácido propiônico (mg . l^{-1})	Proteínas (mg . l^{-1})
0	0	0	258,3	0	0	258
2	41,3	15,4	193,4	49,4	36,7	166,9
4	54,1	19,6	159,3	86,5	45,2	108,0
6	83,9	26,3	63,1	109,0	41,9	69,9
8	119,1	31,3	33,1	119,1	34,4	45,2
10	134,9	27,5	15,8	119,9	26,6	29,3
12	127,8	23,3	11,3	114,5	19,7	18,9
14	106,0	18,5	9,2	105,6	14,2	12,2
16	75,6	13,2	8,8	94,8	10,1	7,9
18	65,2	8,2	4,5	83,6	7,0	5,1
20	72,3	8,2	4,6	72,6	4,8	3,3

Tabela I.16.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína e carboidratos como fonte de carbono.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg . l^{-1})	Ácido propiônico (mg . l^{-1})	Proteínas (mg . l^{-1})	Carboidratos (mg . l^{-1})	Ácido acético (mg . l^{-1})	Ácido propiônico (mg . l^{-1})	Proteínas (mg . l^{-1})	Carboidratos (mg . l^{-1})
0	0	0	266,8	123,3	0	0	266	123,3
2	66,3	35,8	179,3	9,8	65,0	59,1	207,2	44,0
4	-	-	139,9	3,4	93,3	74,5	161,4	15,7
6	86,8	53	118,4	-	102,6	73,8	125,8	5,6
8	90,2	55,5	89,5	-	101,8	67,6	98,0	2,0
10	95,6	58,9	81,7	-	95,6	59,7	76,3	0,7
12	93,4	56,4	72,2	-	86,7	51,6	59,5	0,2
14	83,4	50,3	59,1	-	76,9	44,1	46,3	-
16	74,8	44,4	51,9	-	67,0	37,4	36,1	-
18	47,5	26,8	47,4	-	57,6	31,4	28,1	-
20	33	15,8	20,8	-	49,0	26,3	21,9	-

Tabela I.17.: Concentrações médias de substratos e metabólitos do perfil experimental do RAHLF alimentado com efluente sintético com caseína, carboidratos e lipídeos como fonte de carbono.

L/D	Valores obtidos experimentalmente				Valores previstos pelo modelo			
	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)	Ácido acético (mg .l ⁻¹)	Ácido propiônico (mg .l ⁻¹)	Proteínas (mg .l ⁻¹)	Carboidratos (mg .l ⁻¹)
0	0	0	275,4	123,3	0	0	275	123,3
2	56	25,3	214,3	24,6	86,9	28,0	227,9	47,0
4	68,2	32,9	-	17,9	120,4	45,2	188,9	17,9
6	103,8	52,4	128,4		133,4	54,6	156,6	6,8
8	121,5	57,7	104,6	3,5	138,0	58,6	129,8	2,6
10	138,7	63,8	100,4	3,5	138,6	59,0	107,6	0,9
12	110,1	44,9	74,1	-	136,9	57,1	89,2	0,3
14	138,5	55,6	74,2	-	133,5	53,7	74,0	0,1
16	122,4	47,5	76,4	-	128,9	49,5	61,3	-
18	123,3	45	69,9	-	123,3	44,9	50,8	0,02
20	118,7	40,3	69,1	-	116,9	40,3	42,1	-

Apêndice 2
Valores de DQO dos perfis experimentais dos RAHLFs alimentados com substratos sintéticos

Tabela II.1.: Valores médios de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético a base de SAB.

L/D	Condição 1 (mg . l ⁻¹)	Condição 2 (mg . l ⁻¹)	Condição 3 (mg . l ⁻¹)	Condição 4 (mg . l ⁻¹)
0	397	560	584	616
2	311	513	507	557
4	215	464	475	527
6	189	356	436	465
8	153	277	--	--
10	136	252	366	--
12	129	182	325	275
14	82	150	289	244
16	63	121	239	210
18	46	60	159	117
20	37	37	143	105

Tabela II.2.: Valores médios de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético a base de peptona, (1 g . l⁻¹ de bicarbonato de sódio).

L/D	Condição 1 (mg . l ⁻¹)	Condição 2 (mg . l ⁻¹)	Condição 3 (mg . l ⁻¹)	Condição 4 (mg . l ⁻¹)
0	379	586	625	593
2	244	390	455	459
4	215	350	405	476
6	185	309	410	426
8	177	289	392	404
10	147	280	400	394
12	121	320	389	381
14	103	222	368	371
16	--	200	360	369
18	--	146	335	367
20	95	155	309	351

Tabela II.3.: Valores médios de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético a base de peptona, (400 mg . l⁻¹ de bicarbonato de sódio).

L/D	Condição 1 (mg . l ⁻¹)	Condição 2 (mg . l ⁻¹)	Condição 3 (mg . l ⁻¹)	Condição 4 (mg . l ⁻¹)
0	402	581	625	548
2	260	385	455	430
4	194	349	405	402
6	168	291	410	347
8	105	213	392	309
10	94	193	400	273
12	61	135	389	235
14	54	142	368	190
16	46		360	151
18	35	123	335	145
20	37	123	309	141

Tabela II.4.: Valores médios de DQO nos perfis experimentais do RAHLF alimentado com efluente sintético à base de caseína.

L/D	Condição 1 (mg . l ⁻¹)	Condição 2 (mg . l ⁻¹)	Condição 3 (mg . l ⁻¹)	Condição 4 (mg . l ⁻¹)	Condição 5 (mg . l ⁻¹)
0	439	578	676	414	379
2	330	473	568,5	338	286
4	296	443	535	295	204
6	279	429	497	177	116
8	229	382	--	140	93
10	250	372	448	125	52
12	183	351	392	93	50
14	156	325	408	90	39
16	127	275	380	84	26
18	104	234	384	78	14
20	110	147	361	52	14

ANEXO 3

Dados obtidos nos perfis realizados nos reatores alimentados com efluente de abatedouro de aves utilizados no ajuste cinético

Tabela III.1.: Valores médios de DQO e concentração de proteínas e derivados de hidrólise nos perfis experimentais do UASB alimentado com efluente de abatedouro de aves.

L/D	DQO total (mg . l ⁻¹)	DQO Solúvel (mg . l ⁻¹)	DQO particulada (mg . l ⁻¹)	Concentração de proteínas na fração solúvel (mg SAB . l ⁻¹)
0	607	289	321	92,8
2	152	61	91	54,5
4	160	69	91	63,4
6	106	5	100	41,9
8	96	10	86	43,3
10	111	26	86	28,2
12	121	18	104	--
14	139	43	96	28,1
16	147	51	96	15,9
18	116	23	93	7,3
20	75	--	83	8,3

Tabela III.2.: Valores médios de DQO e concentração de proteínas e derivados de hidrólise nos perfis experimentais do UASB alimentado com efluente de abatedouro de aves.

L/D	DQO particulada (mg . l ⁻¹)	DQO Solúvel (mg . l ⁻¹)	DQO total (mg . l ⁻¹)	Concentração de proteínas na fração solúvel (mg SAB . l ⁻¹)
0	286	321	607	92,3
2	65	91	156	11,5
4	5	101	106	1,9
6	18	86	104	1,9
8	18	104	121	2,8
10	48	96	143	2,3
12	23	88	96	6,9